

胰腺疾病的基础与临床研究进展

李兆申, 潘 雪

李兆申, 潘雪, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科
上海市 200433

李兆申, 男, 1956-10-13生, 河北宁晋县人, 现任第二军医大学附属长海医院消化内科主任, 第二军医大学胰腺疾病研究所副所长, 教授、主任医师、博士生导师。曾获国家自然科学基金、上海市科委、解放军医学卫生系统杰出中青年人才基金资助, 上海市启明星计划基金资助, 长期从事肝胆胰疾病内镜介入诊断与治疗的研究, 特别对胰腺疾病 ERCP 诊断及治疗有独到的见解及突出的成绩, 发表论著近百篇, 获国家、军队、上海市科研成果多项, 享受政府特殊津贴。

项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市杨浦区长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科。zhsl@chxh.com

电话: 021-25070552 传真: 021-55621735

收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-24

摘要

胰腺疾病主要包括胰腺癌, 急、慢性胰腺炎等疾病, 随着人民生活水平的不断提高, 根据流行病学调查, 该病现已成为21世纪严重危害人类生命健康的一类疾病。胰腺癌早期诊断十分困难, 确诊往往已处晚期, 5a生存率不足5%, 加强胰腺癌的基础与临床研究有其必要性和紧迫性。应用基因芯片技术筛选在胰腺癌发病过程中的多个环节上起作用的分子和起关键性调控作用的基因, 对于胰腺癌早期诊断及基因治疗具有重要意义。蛋白质组学研究的发展为寻找新的胰腺癌的肿瘤标志物提供了新的途径。随着影像新技术的发展, 如CT、MRI灌注成像技术、磁共振扩散加权成像(DWI)技术、内镜超声检查(EUS)结合细针穿刺活检术、胰管内超声(IDUS)等为胰腺癌的早期诊断提供了可能。如何提高重症急性胰腺炎(SAP)的治愈率是当前消化系领域中的重要课题。SAP的诊治重点在于对其发病机制的深入研究, 如何缩短疗程、减少费用及提高疗效、制定适合我国国情的诊治指南等方面。国内尚无慢性胰腺炎(CP)理想的诊断标准。CP与胰腺癌的鉴别诊断仍是目前的一大难题, 我国在该领域的基础及临床研究几为空白。因此建立一套慢性胰腺炎的诊治规范也是大势所趋。

李兆申, 潘雪. 胰腺疾病的基础与临床研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12(11):2521-2524

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2521.asp>

0 引言

胰腺疾病是一组非常复杂的疾病, 他主要包括胰腺癌和急、慢性胰腺炎, 是严重威胁人类生命健康的疾病之一。流行病学调查显示在过去的20a中欧美等发达国家胰腺疾病的发病率居高不降, 在我国特别是经济较发达地区胰腺疾病的发病率已与西方国家持平^[1], 因此加强胰腺疾病的基础与临床研究, 尽早攻克这一“21世纪的顽固堡垒”有其必要性和紧迫性。

1 胰腺癌的基础与临床研究

胰腺癌约占全身肿瘤的1-3%, 占消化道肿瘤的8-10%, 居消化道肿瘤死亡原因的第二位。近几年, 胰腺癌发病率明显增高。美国国立癌症研究院(NCI)2002年发表的研究计划显示胰腺癌患者3/4确诊后生存期不超过6 mo, 为第5位致死因^[2]。但是, 如能早期发现胰腺癌, 早期手术治疗则可以显著改善预后。长期以来, 在疾病研究领域存在“重治轻防”的认识误区, 实际上对于胰腺癌易感人群的预测和早期诊断比积极治疗更具有价值。

1.1 胰腺癌早期基因标志物研究 随着人类基因组计划的逐步完成, 现已确定在基因表达调控、机体免疫及细胞分化等重要生命过程中有许多相关基因是成簇排列的, 他们可以分布在一较大的染色质区域或不同染色体上, 在肿瘤发生、发展的复杂过程中相互协调, 共同表达。将这些在肿瘤转移的各个环节和阶段中共同表达的众多基因作为一个“基因群”(gene cluster)进行研究, 筛选在胰腺癌发病过程中的多个环节上起作用的分子和起关键性调控作用的基因, 揭示肿瘤在基因水平的本质, 将对于肿瘤早期诊断及基因治疗具有重要意义^[3]。

寻找和克隆新的肿瘤相关基因一直是一个世界范围的重大课题。以往应用连锁分析和遗传分析技术是一个重要的方法和途径。但是, 对于肿瘤这类数量大遗传性不显著的多基因、多因素疾病的应用有一定的局限性, 效果并不理想。

基因芯片也称为基因微矩阵(Microarray), 是近几年发展起来的一项前沿生物技术。他将大量的靶基因片段有序地、高密度地排列在玻片等载体上, 用荧光检测和计算机软件进行数据的比较和分析, 他在一次实验中可以对上万种基因的表达水平进行快速、准确、高效的检测, 是研究肿瘤发生和转移过程中的各个环节和阶段相互协调、共同表达的基因群的有力工具。

1.2 胰腺癌蛋白质组学研究 虽然基因的研究很广泛, 也很深入, 但也存在一定的缺陷。生命活动的主要体现者或执行者是蛋白质, 蛋白质的表达水平、修饰、存在方式及相互作用等直接与生物功能相关, DNA芯片技术虽然能给出生物体所启动基因的相关信息, 但他并不能反映蛋白质合成的总体情况。再一点, 蛋白质具有自身特有的活动规律, 如蛋白质的修饰加工、转运定位、相互作用等, 这一切都与生物学功能密切联系, 所以要想了解生命活动的真正意义, 还必须在蛋白质

水平上进行研究^[4]。由于蛋白质无法象DNA一样被“扩增”，蛋白质组中含量低的蛋白质在大规模的检测中很难被检测到，而有些对细胞功能产生重大影响的蛋白质其表达量往往是比较低的，因此可以看出，面对生物体在其生命的不同时期合成的比基因组更庞大的整套蛋白质，实现其鉴定这一目标显得更庞大、更复杂和更富有挑战性。只有将蛋白质及蛋白质间的相互作用弄清楚，才能最后搞清楚生命活动的基本规律。

蛋白质组学的研究可以弥补基因研究的不足和缺陷。蛋白质组学是由澳大利亚悉尼 Macquarie 大学的 Marc Willkins 和 Keith Williams 于1995年首次在出版物中提及^[5]。蛋白质组学技术可以从整体上全面地、动态地、定量地分析正常及肿瘤细胞中蛋白质种类和数量的变化。

蛋白质组学研究的发展为寻找新的肿瘤标志物提供了新的途径，尽管对胰腺癌的血清和基因标志物研究很多，但目前尚未有一个具有高度敏感性、高度特异性和准确性的标志物。胰腺癌的早期诊断、早期治疗是提高疗效的关键，因此急需一种能提高早期诊断的肿瘤标志物，而随着蛋白质组学的研究，使胰腺癌的早期诊断有了希望。肿瘤的蛋白质组学技术将有助于阐明蛋白质间的网络调控，发现肿瘤的早期诊断、治疗、预后的特异性标志物，加快肿瘤疫苗的研制和新药的开发。

1.3 胰腺癌早期诊断最新影像技术研究 胰腺癌特别是小胰癌的影像诊断和鉴别诊断仍然是一个难点，随着影像新技术的发展，为胰腺癌的早期诊断提供了可能。计算机断层扫描(CT)、MRI灌注成像技术能定量测定组织的血流灌注值，能获知正常和病变组织血流灌注上存在的差别，由此获知病变的病理状态，从而在肿瘤出现形态改变之前就能获得诊断^[6]。磁共振扩散加权成像(DWI)是利用MRI的特殊序列观察活体组织中水分子微观扩散运动的一种成像方法，对组织和病理的研究深入到更微观的水平。DWI在胰腺、肝脏等脏器局灶性病变的诊断和鉴别诊断等方面都展示了广阔的应用前景^[7]。近年来，新型对比剂的研制和应用，大大提高动态CT和MRI增强扫描对肿瘤的检出和定性能力^[8]。自1980年代初，内镜超声检查术(EUS)的广泛应用，为胰腺肿瘤的诊断和鉴别诊断提供了一种有价值的新方法^[9]。EUS对胰腺肿瘤的显示率高，尤其是对小胰癌的显示较清楚。胰管内超声(IDUS)能显示主胰管及胰实质，而且其敏感性和特异性均高于EUS和CT。结合超声内镜下(EUS)引导下细针穿刺活检术是获取胰腺组织的最佳手段；IDUS及胰管内三维超声成像技术能显示胰腺实质<1cm的病灶甚至原位癌^[10]；彩色多普勒超声内镜(ECDUS)能无创准确显示胰腺血流，为诊断、鉴别诊断胰腺占位和选择治疗方法提供信息。

2 重症急性胰腺炎的发病机制与综合救治

重症急性胰腺炎(SAP)起病急、进展快、病情危重、

复杂多变、并发症多、治疗棘手，费用高昂，死亡率高，所以如何提高SAP的治愈率是当前消化系领域中的重要课题^[11-12]。SAP的诊治重点在于对其发病机制的深入研究，如何缩短疗程、减少费用及提高疗效、制定适合我国国情的诊治指南等方面。

2.1 SAP发病机制的研究 要提高SAP的治疗效果必须从发病机制入手，除了研究酶异常激活的机制外，还要在分子生物学的水平上对免疫应答、全身炎症反应、细胞因子、胰腺微循环障碍等进行深入研究，针对各个环节为临床有效治疗提供依据。SAP的发病机制是由于不同的致病因子引起腺泡细胞的损伤，引发活性胰酶的释放和单核巨噬细胞的激活，过度激活中性粒细胞，激发炎症因子的大量释放，导致胰腺炎症、坏死、微循环障碍和血管通透性增高，引起肠屏障功能失调，肠道细菌移位至胰腺和血循环，造成内毒素血症，激发全身炎症反应综合征(SIRS)，进一步导致多器官衰竭(MOF)^[13]。近年来，日益增多的证据表明炎症因子在SAP发病过程中起着重要作用。参与SAP发生、发展过程中的细胞因子包括白介素IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10以及TNF- α 等；其他炎症递质包括血小板活化因子(PAF)、前列腺素PGI及血栓素A₂、核因子 κ B、黏附分子等。细胞因子一旦产生，不但激活自身，还能促进其他因子的产生，引起连锁和放大效应，即所谓的级联效应(cascades)。目前细胞因子在急性胰腺炎(AP)发病机制中的作用已成为研究和讨论的热点。动物实验研究发现，通过不同的途径阻断细胞因子的功能可提高SAP的生存率，改善其病理生理过程^[14]。在促炎症细胞因子家族中IL-1 β 和TNF- α 被认为是最重要的细胞因子，而IL-1受体拮抗剂和抗TNF- α 抗体治疗SAP尚未达到理想效果。Caspase-1(又称白介素-1) β 转化酶(ICE)是Caspase家族中成员，其主要功能之一是将IL-1 β 、IL-18裂解成具有生物活性的形式，通过抑制Caspase-1而使IL-1 β 、IL-18的激活过程受到抑制，导致细胞因子级联效应减弱，可能对SAP及其全身反应过程具有一定治疗意义^[15]。另外，尽管细胞因子众多，但调控这些细胞因子产生的信号转导通路却为数不多且对其了解不够深入，如能对关键的信号转导通路进行有效的阻断和调节，则可以十分有效地调控促炎细胞因子的产生，阻断SIRS和MOF的发生或减轻其严重程度，明显提高治疗效果。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路是介导细胞外信号引起细胞核反应的极其重要的信号系统，在应激反应、炎症、缺血再灌注等方面发挥着极其重要的作用。探讨MAPK在SAP发病机制中的作用，应用其抑制剂CNI-1493对SAP进行干预可能是SAP诊治的新思路 and 手段^[16]。

2.2 SAP综合救治新技术的开展 SAP病情复杂，并发症多，现有的临床救治方案需时长，医疗费用昂贵。如何开展新的SAP救治新技术，进一步缩短疗程，提高救治成功率是当务之急。

2.2.1 SAP内镜介入治疗及干预时机的探讨 胆系疾病仍是我国SAP最主要的病因,1998年Neoptolemos *et al*^[17]首先应用内镜进行括约肌切开术(EST)治疗急性胆源性胰腺炎(ABP),证实十二指肠逆行胆胰管造影(ERCP)可以在获取诊断的同时提供即时治疗,显著降低了并发症发生率和住院治疗时间,急诊内镜介入治疗已成为胆源性SAP的重要治疗手段^[18].对于重症ABP,目前学术界比较一致的看法是对预测为重症ABP的患者应行48 h内急诊ERCP,解除胆源性梗阻因素.临床研究表明,ABP的严重程度与梗阻持续时间有相关性,但内镜何时进行介入,胰腺炎急诊治疗的指征尚不成熟,国外虽有简易的评价指标,但并不适合我国国情.SAP后期常并发胰腺假性囊肿,超声内镜引导下胰腺囊肿内引流术是近年开展的新技术,Grzebieniak *et al*^[19]比较了内镜与外科手术治疗胰腺假性囊肿的疗效,认为内镜治疗假性囊肿疗效确切,在某些选择性病例中可以替代手术治疗.胰腺假性囊肿一旦感染,通常需要外科手术治疗,以确保充分引流,近年来随着大孔道超声内镜的应用,感染性囊肿也可通过内镜治疗^[20].

2.2.2 早期肠内营养在SAP中的应用 SAP为全身性炎症反应,类似败血症,多呈高代谢状态,蛋白质分解增加,机体产生负氮平衡,小肠功能常因缺乏谷氨酰胺而显著降低,营养代谢治疗为其治疗中重要的一环,既往对SAP主要以肠外营养(PN)为主,但长期PN可使肠黏膜萎缩,诱发肠道细菌易位导致肠源性感染^[21].而开展早期肠内营养(EN),不仅可以促进肠功能的恢复和营养状况的维持,还可减少肠源性感染的发生率,对减少SAP时感染性并发症和死亡率具有积极作用^[22].SAP主要发病机制是胰酶的激活,EN能否减少胰酶分泌,即胰腺休息是其关键点.开始EN的时机是目前争论的焦点,多数国内外学者,主张入院后48–72 h或更早即通过插入鼻空肠管进行EN,此即早期EN^[23].最近报道按Balthazar评分对SAP评分在D和E级者,在72 h后即给予EN,患者完全能够耐受,并发症较PN少,感染并发症也明显下降,费用仅为PN的1/3.且SAP术后早期EN组(术后3–4 d)和后期EN组(术后7 d)相比,早期组血浆白蛋白值升高较快,低蛋白血症纠正比后组早,且无腹痛现象,提示患者术后早期实施EN是安全的,效果良好^[24].国内多数临床医生建议阶段性营养治疗,首先用PN,在发病或手术后2–5 d开始,持续2–3 wk,待患者无明显腹胀、肠蠕动恢复且肛门排气后由PN向EN过渡.肠内营养配方多种多样,有要素饮食(单体)、半要素饮食(寡聚体)、多聚体饮食或特殊配方饮食,配方选择要依据患者病情,在为SAP患者选择配方时要考虑到各种因素,如麻痹性肠梗阻、葡萄糖不耐受、脂肪不耐受等,对包含有谷氨酰胺、精氨酸、 ω -3多不饱和脂肪酸的免疫营养配方在SAP患者的应用,其疗效尚有待进一步观察和研究^[25].另外增加微生物制剂,进一步发挥肠内营养的免疫微生态营

养作用,也是当前的热点课题之一^[26].

2.2.3 SAP的中西医结合治疗 SAP在中医属于“脾心痛”,在目前个体化治疗方案的前提下,中西医结合治疗的效果是肯定的,但目前缺乏统一的中医辨证分型、缺乏规定的疗效判断标准、没有固定的疗效观察指标.进一步加强单方单药及复方的基础研究,并与针灸、理疗、外用药等多种治疗手段紧密结合,提高SAP救治成功率.

2.2.4 早期SAP病程判断标准制定 急性胰腺炎起病发展迅速,如何对早期重症急性胰腺炎的病程进行判断对患者预后至关重要,现有的评分系统各有特色^[27–29],Ranson标准对胆源性胰腺炎的评价不满意,且指标过于繁琐,需48 h才能建立;Glasgow评分是建立在Ranson的工作基础上,他比Ranson简单,其缺点是同样要连续观察自起病至入院后的48 h;APACHE II诊断标准在AP进程中的任何时期都可用来判断其严重程度,观察其变化可判断疾病恢复、发展或恶化,不足之处是其过于复杂而可行性差.一个理想的严重度评分系统应同时有多种用途,基本的要求是能早期预测预后,其次是鉴别病情分类,我们希望结合实验室检查及影像学诊断探索出一系列早期重症急性胰腺炎的判断标准,指导临床应用.

3 慢性胰腺炎的诊断与治疗

在诸多胰腺疾病中,慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)也是一个不可忽视的领域,由于其发病机制不清,目前尚无特异的诊断方法与有效的治疗措施,至今CP仍是困扰人们生活质量的一类胰腺疾病,加强对其基础与临床研究十分必要^[30].

3.1 CP的流行病学研究 有关资料表明,CP的发病率在逐年增加,Tinto *et al*^[31]统计英国1989–1990年与1999–2000年间住院患者中,急性胰腺炎仅增加43%,而CP却增加了一倍之多.国内尚无有关CP的流行病学发病资料,但发病率亦在逐步增加中,只有摸清我国有关CP的流行病学资料,才能进一步防治CP的发生.

3.2 CP发病机制的研究 CP的确切病因尚不清楚,可能与胆道疾病、慢性酒精中毒和高脂餐饮食有关^[32],在我国可能与胆道疾病关系更为密切,但胆道疾病如何发展为CP?目前尚不清楚.

3.3 探讨CP的诊治规范 国内尚无CP理想的诊断标准.以前的旧式诊断标准为1987年桂林所定,也有人沿用日本的诊断标准.另外CP与胰腺癌的鉴别诊断也是临床的难点.随着ERCP、EUS、MRI、PET等新技术的开展,CP又有了更为准确的诊断方法.胰腺外分泌功能诊断研究在我国开展很少,应用于临床诊断的更是有限,胰泌素刺激试验因其操作烦琐,且为有创检查,不宜推广;而BT-PABA、粪弹性蛋白酶检测等试验既不敏感,特异性也不强,大多数在胰腺外分泌功能严重不足时才呈阳性^[33].内镜下CP诊治是近年兴起的新技术、

新疗法, 包括CP的胰管扩张、胰管支架、取石; 假性囊肿EUS下穿刺内引流等. 因此探讨制定符合我国国情的CP诊断新标准十分必要.

4 参考文献

- 1 李兆申. 胰腺癌流行病学研究进展. 解放军医学杂志 2002;27:283-285
- 2 Michaud DS. Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir* 2004;59:99-111
- 3 Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood WH 3rd, Becker KG, Ko MS. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15, 000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9127-9132
- 4 Moller A, Soldan M, Volker U, Maser E. Two-dimensional gel electrophoresis: a powerful method to elucidate cellular responses to toxic compounds. *Toxicology* 2001;160:129-138
- 5 Wilkins MR, Williams KL. The extracellular matrix of the Dictyostelium discoideum slug. *Experientia* 1995;51:1189-1196
- 6 Romijn MG, Stoker J, van Eijck CH, van Muiswinkel JM, Torres CG, Lameris JS. MRI with mangafodipir trisodium in the detection and staging of pancreatic cancer. *J Magn Reson Imaging* 2000;12:261-268
- 7 Herneth AM, Naude J, Philipp M, Beichel R, Trattning S, Imhof H. The value of diffusion-weighted MRT in assessing the bone marrow changes in vertebral metastases. *Radiologe* 2000;40:731-736
- 8 Schima W, Fugger R. Evaluation of focal pancreatic masses: comparison of mangafodipir-enhanced MR imaging and contrast-enhanced helical CT. *Eur Radiol* 2002;12:2998-3008
- 9 Eloubeidi MA, Chen VK, Eltoun IA, Jhala D, Chhieng DC, Jhala N, Vickers SM, Wilcox CM. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy of patients with suspected pancreatic cancer: diagnostic accuracy and acute and 30-day complications. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2663-2668
- 10 Yamao K, Okubo K, Sawaka A, Hara K, Nakamura T, Suzuki T, Shimizu Y, Ozden I. Endolumenal ultrasonography in the diagnosis of pancreatic diseases. *Abdom Imaging* 2003;28:545-555
- 11 Manes G, Rabitti PG, Menchise A, Riccio E, Balzano A, Uomo G. Prophylaxis with meropenem of septic complications in acute pancreatitis: a randomized, controlled trial versus imipenem. *Pancreas* 2003;27:e79-83
- 12 Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. *Lancet* 2003;361:1447-1455
- 13 Inoue K, Hirota M, Kimura Y, Kuwata K, Ohmuraya M, Ogawa M. Further evidence for endothelin as an important mediator of pancreatic and intestinal ischemia in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2003;26:218-223
- 14 Brady M, Christmas S, Sutton R, Neoptolemos J, Slavin J. Cytokines and acute pancreatitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999;13:265-289
- 15 Paszkowski AS, Rau B, Mayer JM, Moller P, Beger HG. Therapeutic application of caspase 1/interleukin-1 β -converting enzyme inhibitor decreases the death rate in severe acute experimental pancreatitis. *Ann Surg* 2002;235:68-76
- 16 Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003;2003:re3
- 17 Finch MD, Neoptolemos JP. Early ERCP in biliary pancreatitis? *HPB Surg* 1998;11:129-131
- 18 Arguedas MR, Dupont AW, Wilcox CM. Where do ERCP, endoscopic ultrasound, magnetic resonance cholangiopancreatography, and intraoperative cholangiography fit in the management of acute biliary pancreatitis? A decision analysis model. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2892-2899
- 19 Grzebieniak Z, Woyton M, Kielan W. Surgical and endoscopic treatment of pancreatic pseudocysts. *Przegl Lek* 2000;57 (Suppl 5):50-52
- 20 Sanchez-Cortes E, Maalak A, Le-Moine O, Baize M, Delhaye M, Matos C, Deviere J. Endoscopic cystenterostomy of nonbulging pancreatic fluid collections. *Gastrointest Endosc* 2002;56:380-386
- 21 Wyncoll DL. The management of severe acute necrotising pancreatitis: an evidence-based review of the literature. *Intensive Care Med* 1999;25:146-156
- 22 Zhao G, Wang CY, Wang F, Xiong JX. Clinical study on nutrition support in patients with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2105-2108
- 23 Dervenis C. Enteral nutrition in severe acute pancreatitis: future development. *JOP* 2004;5:60-63
- 24 Qin HL, Su ZD, Gao Q, Lin QT. Early intrajejunal nutrition: bacterial translocation and gut barrier function of severe acute pancreatitis in dogs. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:150-154
- 25 Chuntrasakul C, Siltham S, Sarasombath S, Sittapairochana C, Leowattana W, Chockvivatanavanit S, Bunnak A. Comparison of a immunonutrition formula enriched arginine, glutamine and omega-3 fatty acid, with a currently high-enriched enteral nutrition for trauma patients. *J Med Assoc Thai* 2003;86:552-561
- 26 Mangiante G, Canepari P, Colucci G, Marinello P, Signoretto C, Nicoli N, Bengmark S. A probiotic as an antagonist of bacterial translocation in experimental pancreatitis. *Chir Ital* 1999;51:221-226
- 27 Ranson JH, Rifkind KM, Roses DF, Fink SD, Eng K, Spencer FC. Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1974;139:69-81
- 28 Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-829
- 29 Balthazar EJ, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JH. Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis. *Radiology* 1990;174:331-336
- 30 许国铭. 加强慢性胰腺炎的基础与临床研究. 胰腺病学 2003;3:1-2
- 31 Tinto A, Lloyd DA, Kang JY, Majeed A, Ellis C, Williamson RC, Maxwell JD. Acute and chronic pancreatitis-diseases on the rise: a study of hospital admissions in England 1989/90-1999/2000. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:2097-2105
- 32 Strate T, Yekebas E, Knoefel WT, Bloechle C, Izbicki JR. aetogenesis and the natural course of chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:929-934
- 33 Chowdhury RS, Forsmark CE. Review article: Pancreatic function testing. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:733-750

胰腺疾病研究现状及面临的问题

李兆申, 潘 雪

李兆申, 潘雪, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科
上海市 200433

李兆申, 男, 1956-10-13生, 河北宁晋县人, 现任第二军医大学附属长海医院消化内科主任, 第二军医大学胰腺疾病研究所副所长, 教授、主任医师、博士生导师。曾获国家自然科学基金、上海市科委、解放军医学卫生系统杰出中青年人才基金资助, 上海市启明星计划基金资助, 长期从事肝胆胰疾病内镜介入诊断与治疗的研究, 特别对胰腺疾病 ERCP 诊断及治疗有独到的见解及突出的成绩, 发表论著近百篇, 获国家、军队、上海市科研成果多项, 享受政府特殊津贴。

项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市杨浦区长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科。zhsli@chxh.com

电话: 021-25070552 传真: 021-55621735

收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-24

摘要

随着全球工业化程度和人民生活水平的不断提高, 胰腺疾病的发病率有逐渐上升的趋势, 已成为全球范围内严重危害人民身体健康和生命的主要病种之一。纵观国内外胰腺疾病的研究现状, 采取多学科联合模式, 基础研究与临床应用相结合, 寻找胰腺癌早期诊断和治疗的新方法、新技术; 根据重症胰腺炎发病规律及病程特点, 探索重症急性胰腺炎综合治疗的新模式, 以提高重症急性胰腺炎的救治成功率, 降低死亡率和医疗费用; 加强对慢性胰腺炎的基础与临床研究, 填补国内在该项研究的空白, 都是当前亟待解决的问题。

李兆申, 潘雪. 胰腺疾病研究现状及面临的问题. 世界华人消化杂志 2004; 12(11):2525-2526

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2525.asp>

0 引言

随着全球工业化程度和人民生活水平的不断提高, 人类疾病谱发生了巨大变化, 胰腺疾病的发病率有逐渐上升的趋势, 已成为全球范围内严重危害人民身体健康和生命的主要病种之一, 是当今国内外研究的难点与热点。

1 胰腺癌的研究现状及亟待解决的问题

1.1 胰腺癌的流行病学 胰腺癌发病率在全世界范围内呈上升趋势, 在英美等西方国家, 近 30 a 来其发病率增加了 3 倍, 是胃肠道相关肿瘤的第二大常见死亡原因^[1]。我国随着生活水平的提高和饮食结构的改变, 城市胰腺癌的患病率 30 a 来也大幅度上升, 并成为近 10 a 来肿瘤死亡原因中上升最快的。在上海地区, 胰腺癌的发病率已跃居第 7 位, 已上升为恶性肿瘤的第 5 大死亡原因^[2]。由于胰腺癌早期诊断困难, 确诊时多属晚期, 一般手术切除率仅 10-20%, 5 a 生存率不足 5%, 因

此, 防治胰腺癌已成为各国医学工作者的紧迫课题。近年报道小胰癌(直径<2 cm)根治切除后 5 a 生存率可提高至 19-60%, 所以, 早期发现、早期诊断是有效治疗胰腺癌、改善预后的关键^[3]。

1.2 胰腺癌的研究现状 胰腺癌的早期诊断率低, 哪些是胰腺癌发病的危险因素, 目前尚不清楚^[4-5]; 胰腺癌又无特异性的临床表现, 误诊率较高; 血清肿瘤标志物如 CA19-9 有一定诊断价值, 但敏感性和特异性均不理想^[6-7]; 胰腺位于腹腔深部, 受毗邻肠腔气体的干扰, 给影像诊断和细胞学诊断带来一定困难, 现有的影像学方法(B 超、ERCP、CT、MRI)均不能发现早期胰腺病变, 且与胰腺良性病变(慢性胰腺炎等)鉴别有困难^[8-9]; 另外国内对胰腺癌的诊断和治疗缺乏统一标准, 使结果缺乏可比性。基于以上胰腺癌的诊断现状, 开展胰腺癌早期诊断新技术, 建立一套简便、实用、准确的胰腺癌诊断流程及规范, 使胰腺癌的研究进入模式化和规范化已成为当时之需。

1.3 胰腺癌研究中亟待解决的问题 鉴于以上胰腺癌的研究现状, 进行以下几方面的研究十分必要: (1)借助流行病学的研究方法, 对胰腺癌的相关因素、各种临床特征进行分析, 确定危险因素和预警症状、筛选高危人群, 密切随访、观察, 力争发现早期患者; (2)力争发现 1-2 个胰腺癌早期诊断标志物, 并建立其在血清、粪便和胰液中简便的检测方法和诊断标准; (3)以基因芯片、组织芯片和蛋白质芯片为切入点, 研究胰腺癌发生、发展过程中的基因变化和蛋白质合成, 通过临床实践筛选出对胰腺癌有早期诊断意义、可用于普查的基因芯片和组织、蛋白质芯片; (4)充分利用最新的影像技术, 对胰腺肿瘤的代谢及组织和病理研究深入到更微观的水平, 大大提高对肿瘤的检出和定性能力; (5)运用 EUS 和 IDUS 及胰管内三维超声成像技术提高对胰腺肿瘤的显示率, 借助 ERCP、EUS 介入技术获取组织学、细胞学标本, 结合病理及分子生物学技术, 提高早期诊断准确率。

2 重症急性胰腺炎的研究现状及亟待解决的问题

重症急性胰腺炎(SAP)起病急、进展快、病情危重、复杂多变、并发症多、治疗棘手, 死亡率高达 40%, 医疗费用昂贵, 严重危害了人们的身心健康^[10]。所以如何提高 SAP 的治愈率、缩短疗程是当前消化系领域中的重要课题。要提高 SAP 的治疗效果必须从发病机制入手, 除了研究酶异常激活的机制外, 还要在分子生物学

的水平上对免疫应答、全身炎症反应、细胞因子、胰腺微循环障碍等进行深入研究,针对各个环节为临床有效治疗提供依据^[11]。

争取SAP在第一期内得以治愈是当前学术探讨的中心课题。对于感染期和恢复期患者,在各种抗感染治疗的同时,营养问题应放在首要位置,但何时、采用何种营养目前尚未有确切方案。近年来发现SAP患者早期肠内营养有助改善肠黏膜屏障,许多特殊营养物可以调节炎症免疫反应,减少内毒素和细菌移位,有望通过特殊的营养支持,预防多器官功能衰竭(MODS)^[12]。

SAP的治疗经历早期外科手术-内科治疗-针对不同病因个体化治疗三次变革,每一次变革都将其临床疗效向前推进,但目前各医院在实施治疗方案时差异较大,方法、时机不统一,各有各的招数,造成资源浪费。中医的临床辨证分型较混乱,中医药的治疗也不规范,手术治疗时机及方式也存在较大的差异,使患者并发症多、住院时间延长、费用增加,死亡率增加。因而规范SAP诊治章程,建立制定一套贯穿SAP全过程的有效、实用、多学科合作的SAP综合治疗新模式有着重要意义。

3 慢性胰腺炎的研究现状及亟待解决的问题

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)的发病呈上升趋势,可能与胆道疾病、慢性酒精中毒增加和高脂餐饮食有关^[13]。由于胰腺解剖部位特殊,其慢性炎症过程较为隐匿,对于早期CP的诊断方法,国内外至今仍处于开发和探索阶段。CP病因不清,国外以酒精性为主,而国内目前看来与胆石可能关系更为密切,国内也尚无该方面的流行病学调查。我国尚无理想的CP诊断标准,以前的旧式诊断标准为1987年桂林所定,也有人沿用日本的诊断标准。另外CP与胰腺癌的鉴别诊断也是临床的难点。随着ERCP、EUS、MRI新技术的开展,CP有了更为准确的诊断方法^[14],再者,我国CP的病因与其他国家有所不同,因此,探讨制定符合我国国情的CP诊断新标准十分必要。胰腺外分泌功能诊断研究在我国开展很少,应用于临床诊断的更是有限^[15],内镜下CP诊治是近年兴起的新技术、新疗法,包括CP的胰管扩张、胰管支架、取石;假性囊肿EUS下穿刺内引流等^[16-17]。

纵观国内外胰腺疾病的研究现状,采取多学科联

合模式,基础研究与临床应用相结合,寻找胰腺癌早期诊断和治疗的新方法、新技术;根据重症胰腺炎发病规律及病程特点,探索重症急性胰腺炎综合治疗的新模式,以提高重症急性胰腺炎的救治成功率,降低死亡率和医疗费用;加强对慢性胰腺炎的基础与临床研究,填补国内在该项研究的空白,都是当前亟待解决的问题。

4 参考文献

- 1 李兆申. 胰腺癌流行病学研究进展. 解放军医学杂志 2002;27:283-285
- 2 Michaud DS. Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir* 2004;59:99-111
- 3 Tsuchiya R, Tajima Y, Matsuzaki S, Onizuka S, Kanematsu T. Early pancreatic cancer. *Pancreatol* 2001;1:597-603
- 4 Klein AP, Brune KA, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, Griffin C, Cameron JL, Yeo CJ, Kern S, Hruban RH. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res* 2004;64:2634-2638
- 5 Mu DQ, Peng SY, Wang GF. Risk factors influencing recurrence following resection of pancreatic head cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:906-909
- 6 Ozkan H, Kaya M, Cengiz A. Comparison of tumor marker CA 242 with CA 19-9 and carcinoembryonic antigen (CEA) in pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1669-1674
- 7 Ziske C, Schlie C, Gorschluter M, Glasmacher A, Mey U, Strehl J, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Prognostic value of CA 19-9 levels in patients with inoperable adenocarcinoma of the pancreas treated with gemcitabine. *Br J Cancer* 2003;89:1413-1417
- 8 Santo E. Pancreatic cancer imaging: which method? *JOP* 2004;5:253-257
- 9 Saisho H, Yamaguchi T. Diagnostic imaging for pancreatic cancer: computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography. *Pancreas* 2004;28:273-278
- 10 Mitchel RM, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. *Lancet* 2003;361:1447-1455
- 11 Raraty MG, Connor S, Criddle DN, Sutton R, Neoptolemos JP. Acute pancreatitis and organ failure: pathophysiology, natural history, and management strategies. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:99-103
- 12 Zhao G, Wang CY, Wang F, Xiong JX. Clinical study on nutrition support in patients with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2105-2108
- 13 Strate T, Yekebas E, Knoefel WT, Bloechle C, Izbicki JR. Pathogenesis and the natural course of chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:929-934
- 14 Albert JG, Rieman JF. ERCP and MRCP-when and why. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16:399-419
- 15 Chowdhury RS, Forsmark CE. Review article: Pancreatic function testing. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:733-750
- 16 Sanchez-Cortes E, Maalak A, Le-Moine O, Baize M, Delhaye M, Matos C, Deviere J. Endoscopic cystenterostomy of nonbulging pancreatic fluid collections. *Gastrointest Endosc* 2002;56:380-386
- 17 Wyncoll DL. The management of severe acute necrotising pancreatitis: an evidence-based review of the literature. *Intensive Care Med* 1999;25:146-156

食管鳞癌中 COX-2 mRNA 的表达以及 NSAID 对其的影响

刘 萱, 李 鹏, 张澍田, 贾继东, 于中麟

刘萱, 李鹏, 张澍田, 贾继东, 于中麟, 首都医科大学附属北京友谊医院
北京市消化疾病中心 北京市 100050
刘萱, 女, 1974-04-22 生, 北京市人, 汉族, 2003 年首都医科大学硕士, 医
师, 主要从事消化系统疾病的治疗和研究。
项目负责人: 张澍田, 100050, 北京市宣武区永安路 95 号, 首都医科大学附
属北京友谊医院, 北京市消化疾病中心。 zhangst@biddc_bfh.com.cn
电话: 010-63014411-3339 传真: 010-63020006
收稿日期: 2004-09-10 接受日期: 2004-09-15

COX-2 mRNA expression in esophageal squamous cell carcinoma before and after treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs

Xuan Liu, Peng Li, Shu-Tian Zhang, Ji-Dong Jia, Zhong-Lin Yu

Xuan Liu, Peng Li, Shu-Tian Zhang, Ji-Dong Jia, Zhong-Lin Yu, Beijing
Center for Digestive Diseases, Beijing Friendship Hospital, Capital
University of Medical Sciences, Beijing 100050, China
Correspondence to: Shu-Tian Zhang, Beijing Center for Digestive
Diseases, Beijing Friendship Hospital, Capital University of Medical
Sciences, Beijing 100050, China. zhangst@biddc_bfh.com.cn
Received: 2004-09-10 Accepted: 2004-09-15

Abstract

AIM: To investigate the potential relationship between COX-2 mRNA expression and human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and to explore the effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) on ESCC.

METHODS: Frozen specimens of human esophageal squamous cell carcinoma ($n = 22$) and adjacent normal esophageal squamous epithelium were examined for COX-2 mRNA expression by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). After incubated with aspirin or nimesulide, proliferation of human esophageal squamous cancer cells (EC-9706 and EC-109) was quantified by MTT assay, and COX-2 mRNA expression in these cells was detected by RT-PCR.

RESULTS: Of 22 cancer specimens, COX-2 mRNA was expressed in 12 cases(54.5%). However, in all the samples of adjacent normal esophageal squamous epithelium, COX-2 mRNA expression were not detected. Both aspirin and nimesulide inhibited EC-9706 cell proliferation and COX-2 mRNA expression. However, aspirin also inhibited EC-109 cell proliferation and COX-2 mRNA expression while nimesulide did not.

CONCLUSION: COX-2 mRNA is frequently expressed in human ESCC and COX-2 may play an important role in carcinogenesis of ESCC. NSAID may be helpful in prevention and treatment of this cancer.

Liu X, Li P, Zhang ST, Jia JD, Yu ZL. COX-2 mRNA expression in esophageal squamous cell carcinoma before and after treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(11):2527-2530

摘要

目的: 检测人类食管鳞癌组织和细胞中 COX-2 mRNA 的表达及 NSAID 对其的影响, 探讨 COX-2 与食管鳞癌发病机制之间可能存在的关系。

方法: 用逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)检测 22 例食管鳞癌患者液氮冻存的食管鳞癌组织和癌周正常食管鳞状上皮组织标本 COX-2 mRNA 的表达。将人类食管鳞癌细胞株与阿司匹林或尼美舒利共同孵育后, 用噻唑蓝法定量检测细胞增生情况, 用 RT-PCR 法检测其 COX-2 mRNA 的表达情况。

结果: 在 22 例食管鳞癌组织标本中有 12 例(54.5%) COX-2 mRNA 表达阳性, 但在癌周正常食管鳞状上皮组织标本均未检测到 COX-2 mRNA 表达。细胞培养结果表明, 阿司匹林和尼美舒利对 EC-9706 细胞株的增生和 COX-2 mRNA 表达均有影响; 但对 EC-109 细胞株, 仅阿司匹林对细胞的增生和 COX-2 mRNA 表达有影响。

结论: 人类食管鳞癌常表达 COX-2 mRNA, 提示 COX-2 有可能在食管鳞癌的发生机制中起重要作用, 而且 NSAID 很可能有助于预防和治疗此病。

刘萱, 李鹏, 张澍田, 贾继东, 于中麟. 食管鳞癌中 COX-2 mRNA 的表达以及 NSAID 对其的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12(11):2527-2530
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2527.asp>

0 引言

食管癌是世界第三大恶性肿瘤, 中国是该病发病率和死亡率较高的国家之一。每年全世界新增加的 30 万食管癌患者中, 约有一半发生在中国, 且多为食管鳞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)。我们通过检测 COX-2 mRNA 在人类食管鳞癌组织和细胞中的表达, 来探讨 COX-2 与食管鳞癌发病机制之间可能存在的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 液氮冻存食管鳞癌组织和癌周正常食管鳞状上皮组织标本各 22 例, 2002-03/2002-12 首都医科大

学附属北京友谊医院胸心血管外科食管癌切除术标本18对,消化内镜中心内镜下活检标本4对.人类食管鳞癌细胞株(EC-9706和EC-109)由中国医学科学院肿瘤医院研究所惠赠. GAPDH(209 bp)上游引物:5' -CCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC ATG G-3'; GAPDH(209 bp)下游引物:5' -CAT GGT GGT GAA GAC GCC AG-3'; COX-2(531 bp)上游引物:5' -AAG CCT TCT CTA ACC TCT CC-3'; COX-2(531 bp)下游引物:5' -TAA GCA CAT CGC ATA CTC TG-3' 则均由博润基因(北京)有限公司制备合成.

1.2 方法 用逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)检测组织和细胞中COX-2 mRNA的表达.扩增的反应条件为94 °C 预变性 2 min, 然后依次是 94 °C 1 min; 54 °C 1 min 和 72 °C 1 min 重复 33 个循环,最后 72 °C 后延伸 5 min. 用噻唑蓝[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]分析法检测人类食管鳞癌细胞株增生情况.其原理为MTT可以被活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶还原成难溶性蓝紫色结晶沉积在细胞体内, DMSO可以溶解这些蓝色结晶,但是在死细胞内 MTT 却不能被还原为蓝紫色结晶,故通过测定在特定波长下吸光度A值的不同可以反映活细胞数.将 $(1-2) \times 10^5$ 个细胞种植在 96 孔板内,每孔 200 μ L, 加入相应的药物和时间处理后,每孔加入 5 g/L MTT 20 μ L 混匀,在 37 °C, 50 mL/L CO₂ 条件下继续培养 4 h, 1 000 r/min 离心 10 min, 吸干每孔内的上清,每孔加入 DMSO 150 μ L 震荡使沉淀充分溶解,酶标仪 492 nm 波长测定吸光度 A 值.将细胞按所用药物[阿司匹林(Aspirin, A6810)和尼美舒利(Nimesulide, N1016)]及浓度分组,为排除药物溶剂二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)的干扰,特设 DMSO 组作为对照(表1).

表1 各组药物终浓度设置

分组	DMSO 终浓度(g/L)	药物浓度
DMSO 组	5	0
单纯细胞组	0	0
A5	5	A6810 5 mmol/L
A10	5	A6810 10 mmol/L
A15	5	A6810 15 mmol/L
A20	5	A6810 20 mmol/L
N100	5	N1016 100 μ mol/L
N200	5	N1016 200 μ mol/L
N400	5	N1016 400 μ mol/L
N800	5	N1016 800 μ mol/L
N1000	5	N1016 1 000 μ mol/L

统计学处理 采用SPSS9.0统计软件进行统计分析. COX-2表达阳性率的比较用 χ^2 检验;细胞培养药物干预结果用非参数检验.

2 结果

2.1 食管鳞癌组织标本 COX-2 表达结果显示,在 22 例食管鳞癌组织标本中有 12 例(54.5%)COX-2 mRNA 表达阳性,但在癌周正常食管鳞状上皮组织标本均未检测到 COX-2 mRNA 表达(图 1, 表 2).

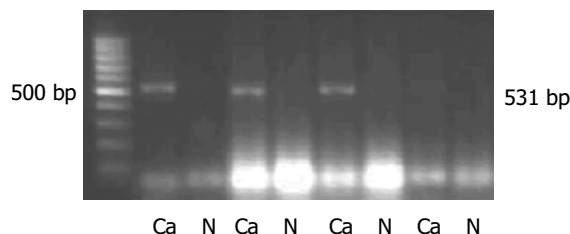


图1 食管鳞癌组织标本 COX-2 表达. Ca: 食管鳞癌组织; N: 癌周正常食管鳞状上皮组织.

表2 食管鳞癌组织标本 COX-2 表达

COX-2 表达	癌组织(Ca)	癌旁组织(N)	总计
阳性	12 ^b	0	12
阴性	10	22	32
总计	22	22	44

^b $P < 0.01$ vs 癌旁组织.

2.2 EC-9706 细胞株药物干预结果显示, 5-20 mmol/L 的阿司匹林和 100-1 000 μ mol/L 的尼美舒利对该细胞株增生和 COX-2 mRNA 表达的影响均具有浓度依赖性(表 3, 图 2).

表3 EC-9706 细胞株药物干预结果

分组	mRNA 表达	MTT 检测
DMSO 组	0.9950 \pm 0.0294	0.467 \pm 0.064
单纯细胞组	1.000 \pm 0.0338	0.475 \pm 0.047
A5	0.9787 \pm 0.0245	0.432 \pm 0.056
A10	0.9506 \pm 0.0267	0.398 \pm 0.046
A15	0.9217 \pm 0.0305 ^a	0.365 \pm 0.031
A20	0.8783 \pm 0.0374 ^b	0.277 \pm 0.030 ^b
N100	0.9907 \pm 0.0232	0.429 \pm 0.032
N200	0.9640 \pm 0.0188	0.419 \pm 0.027
N400	0.9262 \pm 0.0265	0.400 \pm 0.018
N800		0.257 \pm 0.069 ^b
N1000	0.8585 \pm 0.0438 ^b	0.198 \pm 0.021 ^b

^a $P < 0.05$ vs DMSO 组; ^b $P < 0.01$ vs DMSO 组.

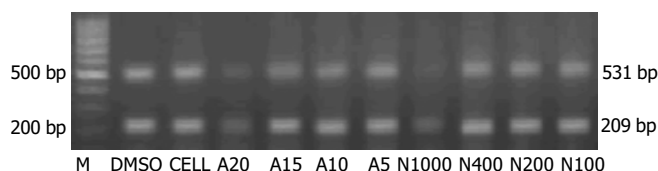


图2 EC-9706 细胞株药物干预结果电泳图. M: 标记物, 间隔 100 bp; 531 bp: COX-2 产物; 209 bp: 内对照产物.

2.3 EC-109细胞株药物干预结果显示,5–20 mmol/L的阿司匹林对该细胞株增生的影响与DMSO组之间的差异均具有极其显著性意义,而对其COX-2 mRNA表达的影响具有浓度依赖性;但100–800 μ mol/L的尼美舒利对其增生和COX-2 mRNA表达的影响与DMSO组之间的差异均无统计学显著性意义(表4,图3)。

表4 EC-109细胞株药物干预结果

组别	mRNA 表达	MTT 检测
DMSO 组	0.9 042 \pm 0.0 231	0.486 \pm 0.056
单纯细胞组	0.9 123 \pm 0.0 127	0.495 \pm 0.049
A5	0.9 013 \pm 0.0 324	0.323 \pm 0.053 ^b
A10	0.8 636 \pm 0.0 312	0.298 \pm 0.044 ^b
A15	0.8 073 \pm 0.0 275 ^a	0.305 \pm 0.037 ^b
A20	0.6 912 \pm 0.0 283 ^b	0.277 \pm 0.034 ^b
N100	0.8 590 \pm 0.0 103	0.459 \pm 0.052
N200	0.8 644 \pm 0.0 276	0.426 \pm 0.043
N400	0.8 543 \pm 0.0 375	0.433 \pm 0.027
N800	0.8 612 \pm 0.0 251	0.417 \pm 0.051

^a $P < 0.05$ vs DMSO 组; ^b $P < 0.01$ vs DMSO 组。

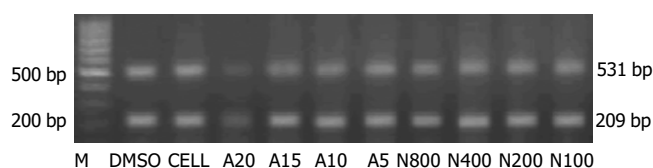


图3 EC-09细胞株药物干预结果电泳图。M: 标记物, 100 bp; 531 bp: COX-2 产物; 209 bp: 内对照产物。

3 讨论

食管鳞癌流行病学地区分布差异显著和高发区明显家族聚集现象的突出特征,提示遗传因素在该病的发生中起重要作用。研究表明,COX-2在食管鳞癌^[1-3]等多种消化系统恶性肿瘤^[4-5]中表达增高,与其发生和发展密切相关^[6-7],而且是食管鳞癌发生的早期事件^[8]。我们的研究结果为COX-2 mRNA在人类食管鳞癌中的表达情况提供了依据,即约54.5%的人类食管鳞癌存在COX-2 mRNA的表达,而在癌周正常鳞状上皮则未发现表达。由于本研究标本例数较少,故还有待于扩大样本量,并在不同地区、不同人群中进行更为广泛深入的研究,才能得出COX-2 mRNA在人类食管鳞癌中表达的总体水平和相互差异。目前研究认为COX-2的致癌机制主要有以下几方面: (1)促进细胞增生,抑制细胞凋亡: COX-2可降低细胞周期素D₁的水平,使细胞G₁期延长,无法进入分裂期,而持续增生,导致细胞发生突变,还可延长异常细胞生存期,拮抗各种刺激诱导的细胞凋亡,增加发生二次突变的机率^[8-10]; (2)促进血管形成: 癌细胞在COX-2表达增高的同时,血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和内皮素-1等促血管生成因子均明显上调,而选择性COX-2抑制剂可显著抑制这些因

子的表达^[11-13]; (3)促进肿瘤细胞的浸润和转移: COX-2可直接上调肿瘤细胞基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)的表达,从而促进肿瘤细胞的浸润和转移^[14-15]。但COX-2的表达与食管鳞癌的发生、发展和预后的关系,仍有待进一步研究^[16-18]。

非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)通过抑制环氧化酶发挥抗炎作用。选择性COX-2抑制剂则既能有效地治疗炎症,又能避免或减轻因抑制COX-1而引起的不良反应。多项研究表明NSAID,特别是选择性COX-2抑制剂,对结肠癌具有防治作用^[19-22],甚至有学者认为对COX-2表达增高的Peutz-Jeghers综合征患者,进行预防性治疗是合理的^[23]。已有的研究亦表明NSAID,特别是选择性COX-2抑制剂,对食管鳞癌具有防治作用^[24-26]。至于NSAID抑制癌症的机制,目前研究认为,NSAID可通过抑制前列腺素合成起到保护p53抑制肿瘤的作用^[27];抑制COX-2的表达和活性有助于恢复单核-吞噬细胞系统的活性和功能^[28-29]; NSAID能够抑制癌细胞端粒酶的活性进而抑制其生长^[30]。在本研究中,非选择性COX-2抑制剂-阿司匹林对食管鳞癌细胞株EC-109和EC-9706的作用均较明显,而选择性COX-2抑制剂-尼美舒利对EC-109的作用不如对EC-9706的作用明显。这一方面说明人类食管鳞癌的发病机制是多种因素共同作用的结果,另一方面也提示我们选择性COX-2抑制剂对人类食管鳞癌的预防和治疗作用是有限的。可见,探求COX-2与人类食管鳞癌的关系以及NSAID对人类食管鳞癌的作用仍需要我们更为深入广泛的研究。

4 参考文献

- Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, Maeda M, Sato F, Itami A, Imamura M. Expression of cyclooxygenase-2 is associated with carcinogenesis of the lower part of thoracic esophageal squamous cell carcinoma and p53 expression. *Oncology* 2002; 62:46-54
- Kase S, Osaki M, Honjo S, Hashimoto K, Adachi H, Tsujitani S, Ito H. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human esophageal mucosa, dysplasia and carcinoma. *Pathobiology* 2004;71:84-92
- Yu HP, Liu L, Shi LY, Lu WH, Xu SQ. Expression of cyclooxygenase-2 in esophageal squamous cell carcinogenesis. *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi* 2004;38:22-25
- Romano M, Claria J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J* 2003; 17:1986-1995
- Sheu BS, Yang HB, Sheu SM, Huang AH, Wu JJ. Higher gastric cyclooxygenase-2 expression and precancerous change in *Helicobacter pylori*-infected relatives of gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:5245-5251
- Wu AW, Gu J, Ji JF, Li ZF, Xu GW. Role of COX-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patients' prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1990-1994
- Yu LZ, Gao HJ, Bai JF, Sun G, Zhao HL, Sun L, Miu K, Zhao ZQ. Expression of COX-2 proteins in gastric mucosal lesions. *World J Gastroenterol* 2004;10:292-294
- Kase S, Osaki M, Honjo S, Adachi H, Tsujitani S, Kaibara N,

- Ito H. Expression of cyclo-oxygenase-2 is correlated with high intratumoral microvessel density and low apoptotic index in human esophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 2003;442:129-135
- 9 陈白莉, 曾志荣, 胡品津, 唐保东, 何瑶, 陈为. 幽门螺杆菌感染与慢性胃炎胃黏膜组织中 COX-2、iNOS 表达的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2004;12:902-906
- 10 Nishihara H, Kizaka-Kondoh S, Insel PA, Eckmann L. Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8921-8926
- 11 谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜勤, 蔡建庭, 钱可大. 选择性环氧合酶-2 抑制剂 Celebrex 对胰腺癌 PGE2 和血管内皮因子表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:979-981
- 12 Chu J, Lloyd FL, Trifan OC, Knapp B, Rizzo MT. Potential involvement of the cyclooxygenase-2 pathway in the regulation of tumor-associated angiogenesis and growth in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2003;2:1-7
- 13 Lim SC. Role of COX-2, VEGF and cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma. *Oncol Rep* 2003;10:1241-1249
- 14 Xue YW, Zhang QF, Zhu ZB, Wang Q, Fu SB. Expression of cyclooxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:250-253
- 15 Li HX, Chang XM, Song ZJ, He SX. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:674-677
- 16 Zhang W, Wang L, Chang A, Jin Y, Rao J. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 expression in premalignant and malignant esophageal glandular and squamous lesions in Cixian, China. *Cancer Detect Prev* 2003;27:243-249
- 17 Yu HP, Xu SQ, Liu L, Shi LY, Cai XK, Lu WH, Lu B, Su YH, Li YY. Cyclooxygenase-2 expression in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Lett* 2003;198:193-201
- 18 Kuo KT, Chow KC, Wu YC, Lin CS, Wang HW, Li WY, Wang LS. Clinicopathologic significance of cyclooxygenase-2 overexpression in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2003;76:909-914
- 19 Yao M, Kargman S, Lam EC, Kelly CR, Zheng Y, Luk P, Kwong E, Evans JF, Wolfe MM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res* 2003;63:586-592
- 20 Yasumaru M, Tsuji S, Tsujii M, Irie T, Komori M, Kimura A, Nishida T, Kakiuchi Y, Kawai N, Murata H, Horimoto M, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Hori M. Inhibition of angiotensin II activity enhanced the antitumor effect of cyclooxygenase-2 inhibitors via insulin-like growth factor I receptor pathway. *Cancer Res* 2003;63:6726-6734
- 21 Williams JL, Nath N, Chen J, Hundley TR, Gao J, Kopelovich L, Kashfi K, Rigas B. Growth inhibition of human colon cancer cells by nitric oxide (NO)-donating aspirin is associated with cyclooxygenase-2 induction and beta-catenin/T-cell factor signaling, nuclear factor-kappaB, and NO synthase 2 inhibition: implications for chemoprevention. *Cancer Res* 2003;63:7613-7618
- 22 Hong SK, Gul YA, Ithnin H, Talib A, Seow HF. Expression of beta-catenin, COX-2 and iNOS in colorectal cancer: relevance of COX-2 and iNOS inhibitors for treatment in Malaysia. *Asian J Surg* 2004;27:10-17
- 23 De Leng WW, Westerman AM, Weterman MA, De Rooij FW, Dekken Hv H, De Goeij AF, Gruber SB, Wilson JH, Offerhaus GJ, Giardiello FM, Keller JJ. Cyclooxygenase 2 expression and molecular alterations in Peutz-Jeghers hamartomas and carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003;9:3065-3072
- 24 Vona-Davis L, Riggs DR, Jackson BJ, McFadden DW. Antiproliferative and apoptotic effects of rofecoxib on esophageal cancer in vitro. *J Surg Res* 2004;119:143-148
- 25 Yu HP, Shi LY, Lu WH, Su YH, Li YY, Xu SQ. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human esophageal cancer and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:638-642
- 26 Kase S, Osaki M, Honjo S, Takeda A, Adachi K, Araki K, Ito H. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS398, inhibits cell growth and induces cell cycle arrest in the G2/M phase in human esophageal squamous cell carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2004;23:301-307
- 27 Swamy MV, Herzog CR, Rao CV. Inhibition of COX-2 in colon cancer cell lines by celecoxib increases the nuclear localization of active p53. *Cancer Res* 2003;63:5239-5242
- 28 Lang S, Lauffer L, Clausen C, Lohr I, Schmitt B, Holzel D, Wollenberg B, Gires O, Kastenbauer E, Zeidler R. Impaired monocyte function in cancer patients: restoration with a cyclooxygenase-2 inhibitor. *FASEB J* 2003;17:286-288
- 29 Sharma S, Stolina M, Yang SC, Baratelli F, Lin JF, Atianzar K, Luo J, Zhu L, Lin Y, Huang M, Dohadwala M, Batra RK, Dubinett SM. Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin Cancer Res* 2003;9:961-968
- 30 胡国勇, 于皆平, 冉宗学, 余保平, 罗和生. 选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利抑制胃癌细胞株 SGC7901 端粒酶的活性. *世界华人消化杂志* 2003;11:25-28

基因和环境因素的交互作用与食管癌的关系

彭仙娥, 史习舜, 周紫荆, 李国梁, 潘培川, 陈子龙, 李文明, 吴清波

彭仙娥, 史习舜, 福建医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计系
福建省福州市 350004
周紫荆, 李国梁, 潘培川, 陈子龙, 李文明, 吴清波, 福建省安溪抗癌
协会 福建省安溪县 362400
彭仙娥, 女, 1976-02-09 生, 江西修水县人, 汉族. 1998 年江西医学院本科
毕业, 2003 年福建医科大学硕士研究生毕业, 助教, 从事流行病学教学与科
研究工作.
项目负责人: 周紫荆, 362400, 福建省安溪县抗癌协会. fमुखe@163.com
电话: 0591-85330586
收稿日期: 2004-04-24 接受日期: 2004-08-05

Relationship between esophageal cancer and interactions of genes and environmental factors

Xian-E Peng, Xi-Shun Shi, Zi-Jing Zhou, Guo-Liang Li,
Pei-Chuan Pan, Zi-Long Cheng, Wen-Ming Li, Qing-Bo Wu

Xian-E Peng, Xi-Shun Shi, Department of Public Health, Fujian Medical
University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China
Zi-Jing Zhou, Guo-Liang Li, Pei-Chuan Pan, Zi-Long Cheng, Wen-Ming
Li, Qing-Bo Wu, Anxi anti-cancer association, Anxi 362400, Fujian
Province, China
Correspondence to: Xian-E Peng, Department of Public Health, Fujian
Medical University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China.
fमुखe@163.com
Received: 2004-04-24 Accepted: 2004-08-05

Abstract

AIM: To explore the risk factors of esophageal cancer and these factors' interaction from the angle of environment and heredity.

METHODS: Using a case-control study, we performed epidemiologic investigations on all the objects. Immunohistochemical method was adopted to detect P53, P16 and CyclinD1 protein expressions in 47 patients and 50 controls. Multivariate analysis was used to assess the relationship between the environmental factors and gene expression in the progress of esophageal cancer.

RESULTS: At the certain level($\alpha = 0.10$) Significant risk factors($P = 0.10$) included substantive intake of mildewed potatoes($P = 6.396$), smoking($P = 3.054$), esophageal cancer with family history($P = 6.120$), over-expression of p53 protein($P = 7.028$) and absent expression of p16 protein($P = 4.676$). Tea drinking($P = 0.241$) and frequent intake of bean product($P = 0.160$) were the protective factors. Synergism was significantly showed in interactions between over-expression of P53 and smoking, substantive intake of mildewed potatoes, esophageal cancer with family history, as well as between absent expression of p16 protein and those above factors. On the contrary, tea drinking could antagonize the mutation of p53 gene and influence family history of esophageal cancer.

CONCLUSION: Environmental factors together with heredity

play important roles in the high incidence of esophageal cancer in Fujian province and the interactions between gene and environment were particularly significant in the development of esophageal cancer.

Peng XE, Shi XS, Zhou ZJ, Li GL, Pan PC, Cheng ZL, Li WM, Wu QB. Relationship between esophageal cancer and interactions of genes and environmental factors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11): 2531-2533

摘要

目的: 从环境、基因、遗传三方面综合探讨食管癌的致病因子以及致病因子之间的交互作用。

方法: 采用病例对照研究, 结合免疫组化SP法检测病例和对照组的组织标本中p53、p16和CyclinD1三种基因蛋白的表达。采用多因素Logistic回归分析方法。

结果: 在 $\alpha=0.10$ 的显著性水准下, 常吃霉变红薯($P=6.396$)、吸烟($P=3.054$)、食管癌家族史($P=6.120$)、P53蛋白表达阳性($P=7.028$)、P16蛋白表达缺失($P=4.676$)等为安溪县食管癌的危险因素, 饮茶($P=0.241$)、豆制品($P=0.160$)是保护因素。因素之间的交互作用效应分析结果表明: P53蛋白高表达、P16表达缺失与吸烟、常食用红薯、食管癌家族史均存在明显的协同作用, 饮茶与p53突变、食管癌家族史之间具有拮抗作用。

结论: 环境、遗传、基因三因素在福建省食管高发区起着重要作用, 基因-环境因素之间的交互作用在食管癌肿瘤的发生过程中尤为重要。

彭仙娥, 史习舜, 周紫荆, 李国梁, 潘培川, 陈子龙, 李文明, 吴清波. 基因和环境因素的交互作用与食管癌的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2531-2533
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2531.asp>

0 引言

人们已经认识到, 食管癌很可能是在环境危险因素和遗传因素的作用下, 在细胞和基因水平经历了多个步骤的改变后发生的, 是多个基因及环境危险因素相互作用的结果。既往有关食管癌病因的研究较多的是针对环境、遗传和基因这三个因素中的某一个因素在食管癌发生中的作用, 极少综合分析这三因素的作用。本次研究在传统的流行病学研究的基础上, 结合检测p53、p16和CyclinD1生物学标志, 从环境、基因、遗传三方面综合探讨安溪县食管癌的致病因子以及致病因子之间的相互作用。

1 材料和方法

1.1 材料 根据在福建省安溪县医院收集到的237例病例的住院号,采用单纯随机抽样方法抽取47例食管癌组织标本(标本经40 g/L 甲醛液固定后常规石蜡包埋).并在该医院收集正常的食管组织标本,获得50例作为对照.并对病例和对照进行问卷调查.研究内容包括两部分:(1)流行病学调查,采用统一的调查表对全部研究对象用同样的方法同等调查,内容包括:一般情况、居住环境、饮食习惯、生活方式、疾病和家族史.(2)实验室检测,采用免疫组化SP法检测病例组、对照组的三种细胞周期蛋白 p53、p16 和 CyclinD1 表达.鼠抗人 p16mAb(即用型)、鼠抗人 p53 mAb (即用型)以及鼠抗人 CyclinD1 mAb (即用型),超敏 SP(鼠)试剂盒、液体 DAB 酶底物显色试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司.

1.2 方法 操作步骤按照 SP(鼠)试剂盒及一抗的要求进行,并用 PBS 代替一抗作空白对照,阳性对照由福州迈新生物技术开发公司提供.在显微镜下观察, p53 阳性为细胞核内出现棕黄色颗粒, p16 为细胞核内或胞质内出现棕黄色颗粒, CyclinD1 主要为细胞核内表达,少数同时伴有胞质表达.按阳性细胞范围分: (-)无明显阳性细胞; (+): 细胞数<25%, (++) :细胞数占 25-50%; (+++): 细胞数>50%.

2 结果

食管癌和对照组在性别、年龄、文化程度等方面的分布差别无统计学意义,但经济状况和职业分布差别有统计学意义,与对照相比较,患者经济状况较差,农民占的比重较高(表1).食管鳞状上皮癌中 p53、p16、CyclinD1 这三种蛋白的异常表达率(分别为 74.5%, 66.0%, 38.3%) 远均高于正常食管黏膜上皮组的异常表达率(分别为 44.0%, 40.0%, 8.0%).

2.1 高发因素非条件 Logistic 回归分析 为了综合评价环境、遗传和基因表达在食管癌发生过程中的作用,以是否患食管癌为因变量,以年龄、性别、p53、p16 及 CyclinD1 三种细胞周期调控因子与安溪县已知的食管癌高发影响因素,如,食盐量、性格内向、吸烟量、一级亲属食管癌家族史、病前 10-20 d 前常食用油炸食品、霉变红薯、腌菜、常饮乌龙茶、饮用清洁水、常吃豆制品、水果等,为自变量,采用逐步选择变量的方法,进行非条件 Logistic 回归分析,结果表明,对食管癌

发病有影响的环境因素为饮乌龙茶、霉变红薯、豆制品、吸烟.其中,常吃霉变红薯、吸烟为危险因素,饮乌龙茶和常吃豆制品是保护因素.对食管癌发病有影响的危险型基因蛋白为 p53 高表达和 p16 表达缺失, CyclinD1 对食管癌发病的作用不明显.食管癌家族史也是一重要的危险因素(表2).

表2 食管癌环境危险因素和细胞周期调控蛋白的多因素分析

变量	β	χ^2	<i>P</i>	<i>OR</i>	95% <i>CI</i>
饮乌龙茶	-1.424	8.524	0.004	0.241	0.093-0.626
吸烟	1.117	5.313	0.021	3.054	1.182-7.894
霉变红薯	1.856	7.357	0.007	6.396	1.673-24.453
豆制品	-1.834	4.906	0.027	0.160	0.032-0.810
食管癌家族史	1.812	5.705	0.017	6.120	1.384-27.060
p53 高表达	1.950	6.135	0.013	7.028	1.502-32.881
p16 表达缺失	1.542	4.411	0.036	4.676	1.109-19.723

2.2 因素之间的交互作用 采用多因素 Logistic 回归模型,该模型中包括单独 A 因素、单独 B 因素和两因素共同组成变量的效应,以进一步分析两因互之间有无交互作用以及交互作用的强度和方式,结果显示,在不饮茶者中, p53 高表达是食管癌的危险因素,而在饮乌龙茶者中, p53 高表达对食管癌的作用并不明显,这表明饮乌龙茶对 p53 高表达有拮抗作用; p53 高表达与吸烟和霉变红薯之间具有协同作用,其协同效应均符合超相乘作用模型,即当 p53 高表达者同时存在吸烟或常吃红薯等因素时,则患食管癌的危险远远高于这些因素的单独作用. p53 高表达与豆制品之间不存在交互作用(表3). p16 表达缺失与吸烟、霉变红薯之间具有协同作用, p16 表达缺失与吸烟之间的协同效应符合次相乘作用,而与霉变红薯之间则符合超相乘作用. p16 蛋白表达缺失与饮茶、豆制品之间的交互作用并不明显(表3). p53、p16 与食管癌家族史之间具有协同作用,其中食管癌家族史与 p53 之间的协同效应符合超相乘作用模型,与 p16 之间符合次相乘作用(表4).在不饮茶者中,一级亲属食管癌家族史是食管癌的危险因素,而在饮乌龙茶者中,一级亲属食管癌家族史对食管癌的危险作用并不明显;食管癌家族史与吸烟、霉变红薯之间具有协同作用,其与吸烟为超相乘作用效应,与霉变红薯为次相乘作用效应.

表1 食管癌病例组和对照组均衡性比较

对象	性别		平均年龄	经济状况 ¹		职业		文化程度	
	男	女		高	低	农民	非农民	小学	初中及以上
病例	27	20	59.60	19	28	44	3	40	7
对照	34	16	58.10	31	19	35	15	37	13

¹ 经济状况低: ≤全县人均月收入, 高: >全县的人均年收入.

表3 p53, p16 与环境因素的交互作用(P 值及 95%CI)

因素	p53 表达		p16 表达	
	阴性	阳性	阴性	阳性
饮乌龙茶	无	1	1	1.462 (0.219–9.751) ^a
	有	0.106 (0.020–0.574)	0.073(0.012–0.442) ^a	0.184 (0.030–1.146)
吸烟史	无	1	1	4.500 (1.089–18.606) ^a
	有	1.402 (0.233–8.419)	3.143(0.617–16.022)	5.943 (1.143–30.907) ^a
霉变红薯	无	1	1	0.607 (0.100–3.685)
	有	4.263 (0.509–35.743)	2.371(0.475–11.842)	10.890 (2.011–58.984) ^a
豆制品	无	1	1	3.398 (0.465–24.813)
	有	0.083 (0.005–1.357)	0.270(0.040–1.839)	0.982 (0.138–7.003)

^a $P<0.05$.表4 食管癌家族史与基因和环境因素的交互作用(P 值及 95%CI)

因素	食管癌家族史	
	无	有
p53 表达	阴性	1
	阳性	2.025 (0.482–8.504)
p16 表达	阳性	1
	阴性	8.201 (1.340–50.204) ^a
饮乌龙茶	无	1
	有	0.142 (0.041–0.495) ^a
吸烟史	无	1
	有	2.054 (0.242–17.425)
霉变红薯	无	1
	有	5.427 (0.930–31.673)
豆制品	无	1
	有	0.096 (0.014–0.673)

^a $P<0.05$.

3 讨论

肿瘤的发生是一个多因素多步骤的过程, 环境因素和遗传物质的相互作用不仅直接作用于基因组, 引起原癌基因激活和肿瘤抑制基因的失活, 而且还调控基因的表达, 本结果显示, 环境、遗传及基因蛋白异常表达在食管癌发生过程中均起重要作用. 主要环境影响因素为饮茶、霉变红薯、豆制品和吸烟, 其中吸烟量大和常食用霉变红薯是安溪县食管癌发生的危险因素, 常饮乌龙茶和常食用豆制品是食管癌发生的保护因素, 这与史习舜 *et al*^[1]的报道相似. 遗传因素(食管癌家族史)及 p53 蛋白高表达及 p16 蛋白表达缺失均能增加患食管癌危险.

疾病很少是纯粹由遗传因素或者环境因素决定的, 基因-环境交互作用在许多疾病, 特别是常见的慢性疾病或者是所谓的“复杂性状疾病”的发病中, 具有非常重要的意义. Kato *et al*^[2]发现, 在食管癌发生过程中, p53 蛋白表达与吸烟之间存在协同作用, p53 蛋白的表达频率随着吸烟量的增加而增高, 与本次研究结果报道相似, 对环境、基因、遗传三因素之间交互作用分析的结果表明, 食管癌家族史、环境危险因素(如吸烟、常吃红薯)与危险基因型(如 p53 蛋白阳性表达、p16 蛋白表达缺失), 三者之间均存在协同作用, 当这些因素同时存在时, 显著增大了患食管癌的危险.

非条件 Logistic 回归分析提示饮乌龙茶是健康保护因素. 环境因素、遗传因素与危险基因型三者之间的相互作用分析结果表明, 无论是对暴露于环境危险因素, 还是携带 p53, p16 突变基因, 或是有遗传背景(一级亲属食管癌家族史)的个体, 常饮乌龙茶均能降低其患食管癌的危险性, 这为乌龙茶的防癌作用提供了重要线索. 但目前有关上述三者之间相互关系的研究极其少见, 而且在本研究中, 参与实验分析的样本量较小, 可能会影响多因素交互作用分析结果的稳定性, 因此, 扩大实验检测的样本量, 开展乌龙茶防癌作用的基础研究, 将是今后有待继续的工作.

4 参考文献

- 1 史习舜, 彭仙娥, 周紫荆, 李文明, 陈子龙. 饮用乌龙茶与食管癌关系的病例对照研究. 中国公共卫生 2003;19:1313-1314
- 2 Kato H, Yoshikawa M, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Tajima K, Masuda N, Tsukada K, Fukuda T, Nakajima T, Kuwano H. Expression of p53 protein related to smoking and alcoholic beverage drinking habits in patients with esophageal cancers. *Cancer Lett* 2001;167:65-72

FHIT 及 nm23-H₁ 基因编码蛋白表达与胃癌临床病理生物学行为

高余佳, 毛晓韵, 吴东瑛, 张淑敏, 辛彦

高余佳, 毛晓韵, 吴东瑛, 张淑敏, 辛彦, 中国医科大学附属一院肿瘤研究所第四研究室 辽宁省沈阳市 110001

高余佳, 女, 1958-12-21 生, 吉林省吉林市人, 汉族, 2001 年中国医科大学肿瘤学研究生, 副主任医师, 主要从事肿瘤临床及基础研究, 现任职于辽宁省肿瘤医院。

国家自然科学基金资助, No. 30371607

项目负责人: 辛彦, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属一院肿瘤研究所第四研究室, yxin@mail.cmu.edu.cn
电话: 024-23256666-6351 传真: 024-22703576

收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-09-19

Protein expression of fragile histidine triad and non-metastasis 23-H₁ and their clinicopathological significance in gastric cancer

Yu-Jia Gao, Xiao-Yun Mao, Dong-Ying Wu, Shu-Ming Zhang, Yan Xin

Yu-Jia Gao, Xiao-Yun Mao, Dong-Ying Wu, Shu-Ming Zhang, Yan Xin, Fourth Laboratory of Cancer Institute, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30371607

Correspondence to: Yan Xin, Fourth Laboratory of Cancer Institute, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yxin@mail.cmu.edu.cn
Received: 2004-07-20 Accepted: 2004-09-19

Abstract

AIM: To explore the expression of fragile histidine triad (FHIT) and non-metastasis 23-H₁ (nm23-H₁) and to investigate their relations with clinicopathological behaviors of gastric cancer.

METHODS: PV9000 two-step immunohistochemical method was employed to detect the expression of FHIT and nm23-H₁ in 98 cases of gastric cancer.

RESULTS: The positive rates of FHIT and nm23-H₁ expression were 38.8% (38/98) and 33% (28/87) respectively. The FHIT expression related to the histological classification, Lauren classification and lymph node metastasis of gastric cancer ($P < 0.05$). The positive rate of FHIT protein expression became higher with the development of gastric cancer, but there was no significance ($P > 0.05$). The nm23-H₁ expression was negatively related to clinical staging and lymph node metastasis ($P < 0.05$).

CONCLUSION: FHIT may be an important candidate of tumor suppressor gene in gastric cancer. The expression of FHIT and nm23-H₁ protein has close relations with lymph node metastasis in gastric cancer, and they may work synergistically and can be important markers for predicting

metastasis and evaluating prognosis of gastric cancer.

Gao YJ, Mao XY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. Protein expression of fragile histidine triad and non-metastasis 23-H₁ and their clinicopathological significance in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(11):2534-2538

摘要

目的: 观察脆性组氨酸三联体(FHIT)基因和nm23基因在胃癌中的表达, 探讨其与胃癌临床病理因素的关系。

方法: 采用PV9000免疫组化二步法检测98例胃癌组织中FHIT和nm23蛋白的表达。

结果: FHIT和nm23在胃癌中表达率分别为38.8%(38/98)和33%(28/87)。FHIT蛋白的缺失在胃癌中占62.1%。胃癌中FHIT的缺失与组织学类型, Lauren分型和淋巴结转移相关($P < 0.05$);临床病理分期愈晚, FHIT蛋白表达缺失率愈高, 但无显著差异($P > 0.05$)。nm23蛋白阳性表达与临床病理分期, 淋巴结转移呈负相关($P < 0.05$)。

结论: 胃癌组织中FHIT蛋白的缺失是频发事件, FHIT可能是胃癌发生中重要的候选抑癌基因。FHIT及nm23基因编码蛋白在胃癌中的表达与胃癌淋巴结转移密切相关, 且可能共同起作用, 可作为临床预测转移及估计预后的重要指标。

高余佳, 毛晓韵, 吴东瑛, 张淑敏, 辛彦. FHIT 及 nm23-H₁ 基因编码蛋白表达与胃癌临床病理生物学行为. *世界华人消化杂志* 2004; 12(11):2534-2538
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2534.asp>

0 引言

胃癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一^[1-4], 胃癌的发生发展涉及多种原癌基因的激活^[5-8]和抑癌基因的失活^[9-12]。脆性组氨酸三联体基因(fragile histidine triad, FHIT)在许多肿瘤中有改变^[13-16], 以缺失为主, 还有外源性序列的插入^[21]。nm23(non-metastasis 23)基因的表达与多种人类恶性肿瘤的发生发展呈负相关^[17-25], 提示他是一种能抑制肿瘤转移表型的转移抑制基因^[26-28]。二者与肿瘤的发生、侵袭及转移抑制有一定的关系。我们采用免疫组化方法对FHIT及nm23-H₁基因在胃癌发生发展过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 1991-01/1992-02 中国医科大学附属第一医

院肿瘤科及辽宁省肿瘤医院外科手术切除胃癌标本 98 例. 其中早期 6 例, 中期 16 例, 晚期 76 例, 术前未放化疗, 平均年龄 54 岁, 男 69 例, 女 29 例. 组织学类型(按 WHO 胃癌组织学分型标准)包括乳头状腺癌 12 例; 管状腺癌 60 例, 其中高分化 3 例, 中分化 12 例, 低分化 45 例; 未分化癌 4 例; 印戒细胞癌 17 例; 黏液腺癌 5 例. 在 98 例胃癌标本中, 有相应癌旁黏膜者 94 例, 其中 39 例可观察到癌旁黏膜肠上皮化生, 4 例可观察到癌旁胃黏膜不典型增生.

1.2 方法 标本以 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m 切片, 而后进行 HE 染色以确定其病理诊断和病理学特征并进行免疫组化染色. 本实验免疫组化染色采用美国 GBI 技术有限公司近年推出的免疫组化检测二步法, Immuno-Bridge+ 试剂盒, 兔抗人 FHIT 多克隆抗体(工作浓度 1:50)和鼠抗人 nm23 单克隆抗体(工作浓度 1:100)均购自北京中山生物技术有限公司, 用 PBS 代替一搞作阴性对照, 以中山公司赠送阳性切片为阳性对照, FHIT 和 nm23-H₁ 蛋白免疫染色阳性信号定位于细胞质, 呈棕黄色颗粒. 每个标本随机观察 5 个有代表性的高倍视野, 每个视野计数 200 个细胞确定其染色强度并取平均值. 阳性细胞数 <5% 为阴性(-), 5-25% 为弱阳性(+), 25-50% 为中度阳性(++), >50% 为强阳性(+++).

统计学处理 计数资料采用 χ^2 检验. $P < 0.05$ 视为有显著统计学差异.

2 结果

2.1 FHIT 蛋白在胃癌组织中的表达 正常胃黏膜的胃体腺, 胃窦腺及癌旁黏膜组织的肠上皮化生 FHIT 蛋白阳性表达率高, 而在表层上皮, 不典型增生及胃癌中 FHIT 蛋白阳性表达率低, 且有显著差异($P < 0.05$). 在 98 例胃癌组织中 60 例(61.2%)FHIT 蛋白缺失(表达阴性), 其余为强弱不等的阳性(38.8%). 阳性表达者乳头状腺癌 9 例; 管状腺癌 18 例(其中高分化 2 例, 中分化 6 例, 低分化 10 例); 未分化 2 例; 印戒细胞癌 6 例, 黏液腺癌 3 例. Lauren 分型中: 71 例弥漫型胃癌中有 21 例呈阳性, 27 例肠型胃癌中有 17 例呈阳性. 淋巴结转移阳性组 FHIT 蛋白表达率(30.1%, 22/73)显著低于未转移者(64.0%, 16/25)($P < 0.05$). 早期胃癌 FHIT 蛋白阳性率 66.7%(4/6), 中期胃癌阳性率 43.8%(7/16), 晚期胃癌阳性率 35.5%(27/76), 无明显统计学差异($P > 0.05$). 淋巴结转移灶 FHIT 蛋白表达阴性 37 例中, 其原发灶 FHIT 蛋白表达阳性 5 例(表 1, 图 1).

2.2 胃癌组织中 nm23-H₁ 蛋白的表达 胃癌标本中 nm23-H₁ 蛋白阳性表达率为 33%(29/87). nm23-H₁ 蛋白在 Lauren 分型中: 弥漫型表达率为 34%(23/67), 肠型阳性表达率为 30%(6/20), 其差异无显著性($P > 0.05$),

nm23-H₁ 蛋白的表达随肿瘤的临床病理分期的演进而降低, 有显著的差异($P < 0.05$). nm23 蛋白阳性表达的病例中只有 12 例出现淋巴结转移, 转移率 41%, 而在 58 例 nm23-H₁ 阴性表达的病例中淋巴结转移率高达 91%, nm23-H₁ 阳性表达者淋巴结转移率明显低于阴性表达者($P < 0.05$, 图 2).

2.3 胃癌组织中 FHIT 蛋白和 nm23-H₁ 蛋白表达均阴性者 37 例, 二者均阳性者 16 例, 两种蛋白表达之间有正相关性($P < 0.01$, 表 2).

表 1 FHIT 蛋白在胃癌及癌旁胃黏膜组织中的表达

分组	n	FHIT 表达		阳性率 %	P
		+	~ +++		
正常表层胃黏膜	13	1	12	7.7	< 0.05
正常胃体腺	31	31	0	100	
正常胃窦腺	7	6	1	85.7	< 0.05
肠上皮化生	39	39	0	100	
不典型增生	4	2	2	50	< 0.05
胃癌	98	38	60	38.8	
乳头状腺癌	12	9	3	75	< 0.01
高分化管状腺癌	3	2	1	66.7	
中分化管状腺癌	12	6	6	50	> 0.05
低分化管状腺癌	45	10	35	22.2	
未分化癌	4	2	2	50	< 0.05
印戒细胞癌	17	6	11	35.3	
黏液腺癌	5	3	2	60	> 0.05
弥漫型	71	21	50	29.6	
肠型	27	17	10	63	< 0.05
胃癌原发灶	50	14	36	28.0	
淋巴转移灶	50	13	37	26.0	< 0.05
胃癌伴淋巴转移	73	22	51	30.1	
胃癌不伴淋巴转移	25	16	9	64	> 0.05
弥漫型原发灶	29	29	0	100	
癌旁肠化生	29	29	0	100	> 0.05
肠型原发灶	10	10	0	100	
癌旁肠化生	10	10	0	100	
合计	39	39	0	100	

表 2 胃癌组织中 FHIT 与 nm23 基因表达的关系

nm23	n	FHIT		阳性率 %
		+	~ +++	
+	26	16	10	61.5
-	52	15	37	28.8
合计	78	31	47	39.7

$P < 0.01$.

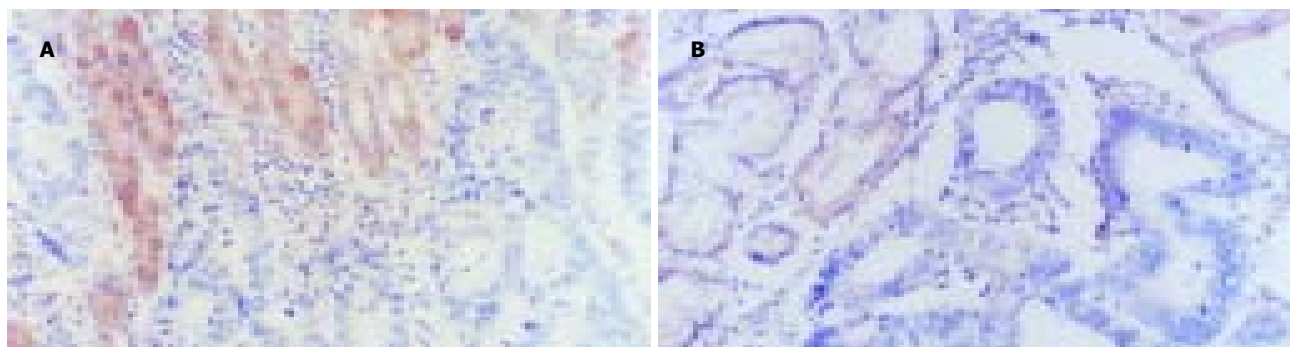


图1 胃癌组织 FHIT 蛋白表达(PV9000 二步法 $\times 200$). A: 胃低分化腺癌 FHIT 表达缺失, 胃固有腺体呈阳性; B: 胃中分化管状腺癌 FHIT 表达缺失, 胃固有腺体呈强阳性.

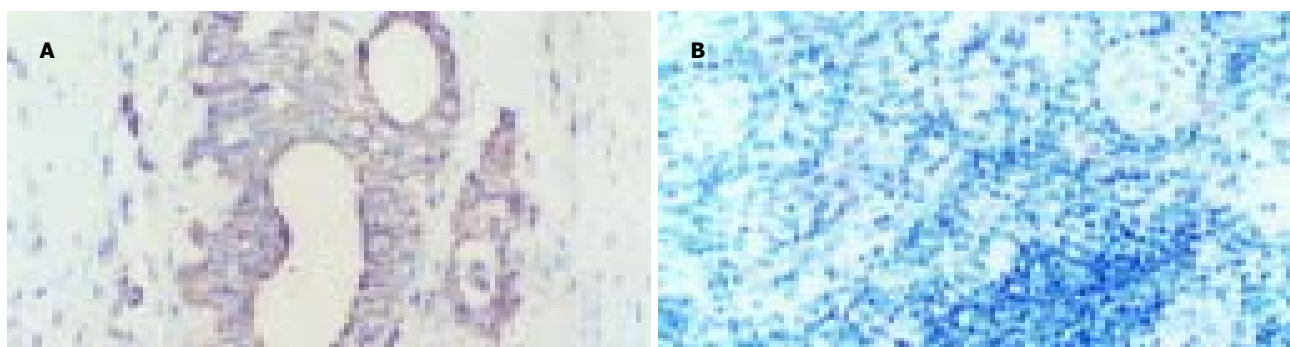


图2 胃癌组织中 nm23-H1 表达(PV9000 二步法 $\times 200$). A: 胃低分化腺癌 nm23-H1 中度阳性; B: 胃低分化腺癌 nm23-H1 阴性.

3 讨论

FHIT (fragile histidine triad) 基因存在于大多数正常组织中^[16-17], 而多种肿瘤组织中 FHIT 表达降低或丢失, 提示 FHIT 基因为多种肿瘤的候选抑制基因^[18-20]. 由于在染色体 3p14.2 上发现原发性胃癌存在着高机率的杂合子缺失和胃癌细胞株纯合子缺失, 而 FHIT 基因正是位于这个位点, 因此认为 FHIT 基因在胃癌的发生发展过程中起着重要作用^[29]. Huiping *et al*^[30] 检测 50 例胃癌患者 FHIT 基因的改变, 发现 84% 患者存在该部位一个或多个微卫星标记的杂合性缺失, 导致 FHIT 等位基因全部或部分缺失. 87% 患者 RT-PCR 产物有异常 FHIT 转录本. 测序结果显示, 异常的 FHIT 转录本的产生均符合“GT-AG”的剪切原则, 因此, 该位点高度的不稳定性致 FHIT mRNA 前体剪切异常可能是 FHIT 异常转录本高频率出现的主要原因. 78% 胃癌患者 FHIT 蛋白表达减少或完全缺失. 此外, 27% 患者癌细胞内存在由细胞错配修复机制的异常微卫星不稳定性 (MSI), 其中 77% MSI 位于 FHIT 基因第 4, 5 内含子, 内含子 MSI 的出现可致 FHIT 的 mRNA 前体异常剪切或 FHIT 基因转录功能降低, 而使 FHIT 蛋白表达减少, 晚期胃癌患者 FHIT 蛋白表达水平与局部淋巴结转移率呈负相关. Baffa *et al* 对原发性胃癌的研究发现, 51% 的标本存在 FHIT 基因的缺失或重排, 而 67% 的癌组织缺乏 FHIT 蛋白的表达. 胃癌是长期暴露于致癌因素中发展而来, FHIT 基因中包含脆性位点 FRA3B 和 *t*(3;8) 易位的断裂位点, 因此对致癌因素诱导的改变极其敏感. 这可能是胃癌中

FHIT 基因异常率高的原因. Lee *et al*^[31-32] 实验表明, FHIT 蛋白缺失率表达 62.9% 且与年龄, 性别, 肿瘤部位, 临床分期等临床因素无相关性. Capuzzi *et al* 对 55 例胃腺癌的研究表明, 49% 的病例显示 FHIT 蛋白完全缺失, 胃癌中 FHIT 蛋白表达缺失与 Lauren 分型, 肿瘤浸润, 核分级无关, 而与分级, 分期, 生存期相关, 分级愈高, 分期愈晚, FHIT 基因缺失率愈高. FHIT 蛋白表达阴性患者存活时间明显低于 FHIT 蛋白表达阳性患者. 我们研究结果 FHIT 蛋白缺失率为 61.2%, 与文献报道相近, FHIT 蛋白表达缺失与肿瘤的组织学类型, Lauren 分型及淋巴结转移由显著相关性 ($P < 0.05$), 亦与临床病理分期有关, 分期愈晚, FHIT 蛋白缺失率愈高, 但并无统计学意义, 只可能是由于本组资料中早期胃癌例数太少所致. 表明 FHIT 基因及其表达产物的异常是胃癌中常见的肿瘤抑制机制: ApnA-FHIT 聚合物细胞凋亡传导信号假说, Sard 和 Ji *et al* 的转基因研究提示 FHIT 基因可能参与了调节细胞凋亡型号的传导, 从结构和功能上看 FHIT 蛋白均是一种典型的 ApnA 水解酶, 而 ApnA 又是参与细胞内增值的凋亡信号传导的重要因子, 以上研究提示 FHIT 基因, ApnA 细胞增值和凋亡之间可能存在某种内在的联系.

nm23 基因是 1988 年由 Steeg *et al* 首先分离并鉴定的一种与肿瘤转移表型抑制相关的基因, 与核苷二磷酸激酶 (NDPK) 有高度同源性^[33-34]. 近年来已分离到人的两个 nm23DNA 克隆, 即 nm23-H₁ 和 nm23-H₂ 型, nm23-H₁ 和 nm23-H₂ 为两个完全不同的基因, 而且他们受两

个独立的调控系统所调节. nm23-H₁低表达者癌组织浸润深度和淋巴结转移率大于表达高者. Wang *et al*^[35]对胃癌患者 nm23-H₁mRNA 水平检测结果表明 T3, T4 期胃癌的 nm23-H₁mRNA 水平较 T1, T2 期明显降低. 有淋巴结转移的 mRNA 水平低于无淋巴结转移组, 分化好的胃癌 mRNA 水平高于分化差的胃癌; nm23-H₁RNA 水平低的患者总生存时间缩短. 本组研究表明, nm23 蛋白阳性表达与临床病理分期及淋巴结转移显负相关 ($P<0.05$). 提示 nm23-H₁ 基因的缺失和突变与胃癌淋巴结转移有关, nm23 基因在胃癌淋巴结转移中发挥负性调节作用. nm23-H₁ 很可能是通过 NDPK 相似的途径调节细胞信号的传递, 细胞分化等过程中发挥作用. NDPK 是细胞二磷酸核苷的供给者, 通过信号转导影响肿瘤细胞微管聚合从而调节细胞骨架蛋白的活动, 抑制癌的转移, 此外, NDPK 参与影响 G 蛋白的信号传递发挥负调节作用, 影响构型, 运动, 黏附及有丝分裂纺锤体的形成, 最终控制细胞增值. 所有这些作用直接影响了肿瘤形成和转移表型的表达. Steeg *et al*认为 Ela 基因抑制 ras 基因激活的癌细胞转移是通过促进细胞内 nm23 基因而实现的. 因此, nm23 基因的变化绝不是单一的变化, 是多个基因之间的协调作用, 从而影响肿瘤的形成与转移. 另外, 本研究发现, 在 nm23-H₁ 阳性表达 26 例中, FHIT 阳性表达率为 61.5% (16/26), 而 nm23-H₁ 阴性表达 52 例中, FHIT 阴性表达率为 71.2% (37/52), 表明 FHIT 和 nm23-H₁ 蛋白表达有明显正相关性 $P<0.05$, 说明 FHIT, nm23-H₁ 基因在胃癌细胞的浸润, 转移中可能共同起作用. 其确切机制尚待进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 Yu Y, Zhang YC, Zhang WZ, Shen LS, Hertzog P, Wilson TJ, Xu DK. Ets1 as a marker of malignant potential in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2154-2159
- 2 Wang MC, Yang YM, Li XH, Dong F, Li Y. Maspin expression and its clinicopathological significance in tumorigenesis and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:634-637
- 3 Fu YG, Qu YJ, Wu KC, Zhai HH, Liu ZG, Fan DM. Apoptosis-inducing effect of recombinant Caspase-3 expressed by constructed eukaryotic vector on gastric cancer cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2003;9:1935-1939
- 4 Zhao XH, Gu SZ, Liu SX, Pan BR. Expression of estrogen receptor and estrogen receptor messenger RNA in gastric carcinoma tissues. *World J Gastroenterol* 2003;9:665-669
- 5 Li HX, Chang XM, Song ZJ, He SX. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:674-677
- 6 Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58
- 7 Xin Y, Li XL, Wang YP, Zhang SM, Zheng HC, Wu DY, Zhang YC. Relationship between phenotypes of cell-function differentiation and pathobiological behavior of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001;7:53-59
- 8 Han CB, Li F, Zhao YJ, Ma JM, Wu DY, Zhang YK, Xin Y. Variations of mitochondrial D-loop region plus downstream gene 1 2S rRNA-tRNA(phe) and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:1925-1999
- 9 Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58
- 10 Zhang XM, Sheng SR, Wang XY, Bin LH, Wang JR, Li GY. Expression of tumor related gene NAG6 in gastric cancer and restriction fragment length polymorphism analysis. *World J Gastroenterol* 2004;10:1361-1364
- 11 Zhao GH, Li TC, Shi LH, Xia YB, Lu LM, Huang WB, Sun HL, Zhang YS. Relationship between inactivation of p16 gene and gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:905-909
- 12 Han CB, Li F, Yang XF, Mao XY, Wu DY, Xin Y. Alteration of mtDNA copy number in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12:258-261
- 13 Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM. Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003;63:3352-3355
- 14 Kuwai T, Tanaka S, Kaio E, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Clinical significance of Fhit expression in development of colorectal carcinoma of various macroscopic types. *Int J Mol Med* 2003;12:437-442
- 15 Mady HH, Melhem MF. FHIT protein expression and its relation to apoptosis, tumor histologic grade and prognosis in colorectal adenocarcinoma: an immunohistochemical and image analysis study. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:351-358
- 16 Yendamuri S, Kuroki T, Trapasso F, Henry AC, Dumon KR, Huebner K, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM. WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003;63:878-881
- 17 Zhao P, Song X, Nin YY, Lu YL, Li XH. Loss of fragile histidine triad protein in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1216-1219
- 18 Huang LW, Chao SL, Chen TJ. Reduced Fhit expression in cervical carcinoma: correlation with tumor progression and poor prognosis. *Gynecol Oncol* 2003;90:331-333
- 19 Yang Q, Nakamura Y, Nakamura M, Yoshimura G, Suzuma T, Umemura T, Mori I, Sakurai T, Kakudo K. Loss of Msh2 is not associated with FHIT deletion in breast carcinomas. *Anti-cancer Res* 2002;22:2591-2595
- 20 Tsujiuchi T, Sasaki Y, Kubozoe T, Konishi Y, Tsutsumi M. Alterations in the Fhit gene in pancreatic duct adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in hamsters. *Mol Carcinog* 2003;16:60-66
- 21 Sukosd F, Kuroda N, Beothe T, Kaur AP, Kovacs G. Deletion of chromosome 3p14.2-p25 involving the VHL and FHIT genes in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:455-457
- 22 Wang YF, Chow KC, Chang SY, Chiu JH, Tai SK, Li WY, Wang LS. Prognostic significance of nm23-H1 expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2004;90:2186-2193
- 23 Soliani P, Ziegler S, Romani A, Corcione L, Campanini N, Dell'Abate P, Del Rio P, Sianesi M. Prognostic significance of nm23 gene product expression in patients with colorectal carcinoma treated with radical intent. *Oncol Rep* 2004;11:1193-1200
- 24 Goncharuk VN, del-Rosario A, Kren L, Anwar S, Sheehan CE, Carlson JA, Ross JS. Co-downregulation of PTEN, KAI-1, and nm23-H1 tumor/metastasis suppressor proteins in non-small cell lung cancer. *Ann Diagn Pathol* 2004;8:6-16
- 25 Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, Akamatsu H, Higashihara M, Honma Y, Okabe-Kado J, Hirano M. Clinical significance of intracytoplasmic nm23-H1 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:2482-2490
- 26 Nanashima A, Yano H, Yamaguchi H, Tanaka K, Shibasaki S, Sumida Y, Sawai T, Shindou H, Nakagoe T. Immunohistochemical analysis of tumor biological factors in hepatocellular carcinoma: relationship to clinicopathological factors and prog-

- nosis after hepatic resection. *J Gastroenterol* 2004;39:148-154
- 27 Chen JQ, Zhan WH, He YL, Peng JS, Wang JP, Cai SR, Ma JP. Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004;10:776-782
- 28 D'Angelo A, Garzia L, Andre A, Carotenuto P, Aglio V, Guardiola O, Arrigoni G, Cossu A, Palmieri G, Aravind L, Zollo M. Prune cAMP phosphodiesterase binds nm23-H1 and promotes cancer metastasis. *Cancer Cell* 2004;5:137-149
- 29 Rocco A, Schandl L, Chen J, Wang H, Tulassay Z, McNamara D, Malfetheriner P, Ebert MP. Loss of FHIT protein expression correlates with disease progression and poor differentiation in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:84-88
- 30 Huiping C, Kristjansdottir S, Bergthorsson JT, Jonasson JG, Magnusson J, Egilsson V, Ingvarsson S. High frequency of LOH, MSI and abnormal expression of FHIT in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2002;38:728-735
- 31 Lee SH, Kim WH, Kim HK, Woo KM, Nam HS, Kim HS, Kim JG, Cho MH. Altered expression of the fragile histidine triad gene in primary gastric adenocarcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:850-855
- 32 Lee SH, Kim CJ, Park HK, Koh JW, Cho MH, Baek MJ, Lee MS. Characterization of aberrant FHIT transcripts in gastric adenocarcinomas. *Exp Mol Med* 2001;33:124-130
- 33 Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomembr* 2003;35:31-40
- 34 Roymans D, Willems R, Van Blockstaele DR, Slegers H. Nucleoside diphosphate kinase (NDPK/NM23) and the waltz with multiple partners: possible consequences in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:465-476
- 35 Wang CS, Lin KH, Hsu YC. Alterations of thyroid hormone receptor alpha gene: frequency and association with Nm23 protein expression and metastasis in gastric cancer. *Cancer Lett* 2002;175:121-127

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库。该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表的各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%)。

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序)。论文排序: 期刊论文数, 点击论文数。

2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体

3p21 区域一个表达下调的 **EST** 的鉴定. 癌症 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 **3p21** 区域一个表达下调的 **EST** 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点。本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础。方法: 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选; 运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR) 方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达; 并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况。结果: 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5) 的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34) 的鼻咽癌活检组织检测到有 EST(N31985) 表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义(P<0.05)。结论: 染色体 3p21 区域 EST (N31985) 在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌癌变过程。(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

乏氧对胃癌细胞系 MGC803 细胞周期、乏氧相关基因和蛋白表达的影响

李建军, 李宏宇, 辛彦, 陈延治, 李光, 刘意, 张素敏, 吴东瑛

李建军, 陈延治, 李光, 刘意, 中国医科大学附属第一医院放疗科
辽宁省沈阳市 110001

李宏宇, 沈阳军区总医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

辛彦, 张素敏, 吴东瑛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第四研究室 辽宁省沈阳市 110001

李建军, 男, 1969-11-01 生, 辽宁省凤城市人, 汉族, 2004 年中国医科大学博士, 主治医师. 主要从事消化系统肿瘤的基础及临床研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30371607

项目负责人: 辛彦, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第四研究室. yxin@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-23263946 传真: 024-23263946

收稿日期: 2004-07-12 接受日期: 2004-08-30

Effect of hypoxia on cell cycle and gene and protein expression in gastric cancer cell line MGC803

Jian-Jun Li, Hong-Yu Li, Yan Xin, Yan-Zhi Chen, Guang Li, Yi Liu, Su-Min Zhang, Dong-Ying Wu

Jian-Jun Li, Yan-Zhi Chen, Guang Li, Yi Liu, Department of Radiotherapy, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Hong-Yu Li, Department of Gastroenterology, General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110014, Liaoning Province, China

Yan Xin, Su-Min Zhang, Dong-Ying Wu, Fourth Laboratory of Cancer Institute, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yan Xin, Fourth Laboratory of Cancer Institute, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yxin@mail.cmu.edu.cn

Received: 2004-07-12 Accepted: 2004-08-30

Abstract

AIM: To investigate the effect of hypoxia on cell cycle, expression of mitochondrion ATP6 (mtATP6), mitochondrion Cyt-b (mtCyt-b), PTEN mRNA, vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) protein in human gastric cancer cell line MGC803.

METHODS: The MGC803 cells were exposed to anoxic environment for 0, 2, 8, 16, 24 h. The cell cycle was measured by flow cytometry, and the expression of mtATP6, mtCyt-b and PTEN mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Expression of VEGF and EGFR protein was determined by Western blot assay.

RESULTS: At 0, 2, 8, 16, and 24 h hypoxia, the rates of ATP6 mRNA expression of MGC803 cells were 78.22%, 69.28%, 84.40%, 39.84% and 42.52% respectively; Cyt-b mRNA expression was 83.40%, 75.87%, 64.57%,

79.05% and 77.44% respectively; PTEN mRNA expression was 23.93%, 26.52%, 35.74%, 40.31% and 49.92% respectively; VEGF protein expression was 16.1, 16.5, 18.2, 20.6, 27.5 and EGFR protein expression was 14.3, 17.2, 18.1, 32.6 and 37.7 respectively. The expression of PTEN mRNA, VEGF and EGFR proteins *in vitro* increased with the extending of hypoxia time. Expression of mtATP6 mRNA at 24 h was significantly reduced as compared with that under normal oxygen condition, and mtCyt-b mRNA was transiently reduced at 8 h but returned to normal level at 24 h. The MGC803 G₁ phase cells and apoptotic cells transiently increased after hypoxia as compared with those under normal oxygen condition. However, distribution of cell cycle at 24 h was similar to that under normal oxygen condition. There was no significant relation between hypoxia time and changes of cell cycles ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Hypoxia transiently prolongs MGC803 G₁ phase and increases apoptotic rate of MGC803 cells. It up-regulates the expression of PTEN mRNA, VEGF and EGFR protein, and down-regulates the expression of mtATP6 mRNA.

Li JJ, Li HY, Xin Y, Chen YZ, Li G, Liu Y, Zhang SM, Wu DY. Effect of hypoxia on cell cycle and gene and protein expression in gastric cancer cell line MGC803. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2539-2542

摘要

目的: 观察胃癌细胞系 MGC803 乏氧不同时间细胞周期、抑癌基因 PTEN、线粒体 ATP6(mtATP6)和线粒体 Cyt-b(mtCyt-b)mRNA 及 VEGF、EGFR 蛋白表达变化。

方法: 将 MGC803 细胞($1.0 \times 10^{10}/L$)施加乏氧(10 mL/L O_2)处理 0, 2, 8, 16, 24 h. 应用 RT-PCR, Western blot, 流式细胞术对 MGC803 细胞进行检测。

结果: MGC803 细胞乏氧 0, 2, 8, 16, 24 h 时 ATP6 mRNA 表达量为 78.22%, 69.28%, 84.40%, 39.84%, 42.52%; Cyt-b mRNA 为 83.40%, 75.87%, 64.57%, 79.05%, 77.44%; PTEN mRNA 为 23.93%, 26.52%, 35.74%, 40.31%, 49.92%; VEGF 蛋白表达量为 16.1, 16.5, 18.2, 20.6, 27.5; EGFR 蛋白为 14.3, 17.2, 18.1, 32.6, 37.7. 结果显示乏氧后 ATP6 mRNA 表达水平下降, 8 h 后又升高, 以后随着时间的延长, ATP6 mRNA 再次下降; Cyt-b mRNA 乏氧 8 h 出现一过性下降, 24 h 又恢复到乏氧前水平; PTEN mRNA、VEGF 和 EGFR 蛋白表达水平随乏氧时间延长也逐渐增加, 乏氧 24 h 表达最高;

乏氧使MGC803细胞发生G₁期阻滞,凋亡细胞增多,S期细胞减少,但24 h后细胞周期分布基本恢复至乏氧前水平,乏氧时间与MGC803细胞周期的改变无相关性($P>0.05$).

结论: 乏氧使MGC803细胞发生一过性G₁期阻滞,增加PTEN mRNA和VEGF、EGFR蛋白表达,降低mtATP6 mRNA的表达.

李建军, 李宏宇, 辛彦, 陈延治, 李光, 刘意, 张素敏, 吴东瑛. 乏氧对胃癌细胞系MGC803细胞周期、乏氧相关基因和蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2539-2542

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2539.asp>

0 引言

乏氧是实体性肿瘤物理微环境的基本特征之一,乏氧不但可以诱导肿瘤细胞对放疗及化疗的耐受性,同时可促进肿瘤进展,越来越多的证据表明乏氧是决定恶性肿瘤预后的重要因素^[1-2].有研究表明,抑癌基因与细胞骨架蛋白tensin同源在肿瘤的10号染色体有缺失的磷酸脂酶(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, PTEN)抑制肿瘤增生及分裂^[3-6],线粒体呼吸链和细胞色素氧化酶在细胞中感受氧浓度、诱导一些乏氧相关基因表达方面起作用^[7].我们通过观察胃癌细胞系MGC803乏氧不同时间细胞周期,PTEN、线粒体ATP6(mtATP6)和线粒体(mt Cyt-b)mRNA及血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)蛋白表达的变化,探讨乏氧对MGC803细胞基因、蛋白及细胞周期表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞系MGC803为中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所保存,用含100 mL/L胎牛血清(中国医学科学院血液研究所,北京)、0.3 g/L谷氨酰胺、100 kU/L青霉素和0.1 g/L链霉素的RPMI 1640培养液(Gibco公司,美国)进行单层传代培养,置37℃,50 mL/L CO₂培养箱内,取指数生长期细胞进行实验.将MGC803细胞分成乏氧0, 2, 8, 16, 24 h组.将含有10 mL/L O₂, 50 mL/L CO₂, 940 mL/L N₂的混合气体通入装有无菌PBS(0.1 μmol/L)缓冲液的瓶中,密闭瓶盖上并联插入2组培养瓶,每组在预先设定乏氧时间分别串联密闭的培养瓶,每个培养瓶塞上插入一个带阀门的针头,通气时将带注射针头的阀门打开,尽快将空气排空,从入气口输入混合气20 min(流量3 L/min),使气体达到平衡后减少混合气流量至0.1 L/min,维持装置内低氧状态.

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR MGC803细胞经不同时间乏氧后,用2.5 g/L胰蛋白酶消化并收集培养的细胞,制成细胞悬液并计算细胞数,每个样本收集等量细胞(3.0×10^6),按试剂盒说明书操作提取总RNA,总RNA沉淀溶于1 g/L

DEPC处理过的无RNA酶蒸馏水中,-80℃保存.根据Primer5软件进行引物设计:mtATP(148 bp),F: 5' - CGCCTAACC GCCTAACATTAC-3', R: 5' - AGCGGACAGCGATTCT A-3', β-actin(309 bp), F: 5' - AGCGGGAAATCGTGCGTG-3', R: 5' - CAG GGTACATGCTGCTGCC-3', mtCyt-b (304 bp), F: 5' - GCGCCTCAAATATTCTTTA-3', R: 5' - GAAGGGCAAGATGAAGT-3', GAPDH (528bp), F: 5' - AC CACCATGGAGAAGGCTGG-3', R: 5' - CTCAG TGTAGCCCAGGATGC-3', PTEN (209bp), F: 5' - CATTATGACACCGCCAAA-3', R: 5' - TTGCCCCG AT GTAATAAA-3', β-actin (381 bp), F: 5' - ACA CTGTGCCCATCTACGAGG -3', R: 5' - CTTTGCGG ATGTCCACGTC-3',引物由上海生工公司合成.取总RNA 2 μL作为模板,加入随机引物2 μL(1 μmol/L),总反应体系为20 μL,采用AMV逆转录酶18.34 nkat (Takara公司)将总mRNA反转录成cDNA;取反转录反应液5 μL分别加入上述各引物,采用日本Takara公司试剂盒将cDNA产物分别进行PCR扩增.PCR反应条件为:94℃ 4 min变性,循环条件为94℃ 30 s, 56℃ 40 s, 72℃ 40 s, 30次循环,72℃延伸5 min,反应体系为50 μL.取PCR产物10 μL经15 g/L琼脂糖凝胶电泳后,溴化乙啶染色,应用ChemImage 5500自动成像分析仪对DNA电泳条带进行分析,测定各条带的面积和灰度值,得出积分灰度值,计算各个样品mtATP/β-actin, mtCyt-b/GAPDH, PTEN/β-actin比值作为mRNA表达的相对定量.

1.2.2 Western blot 胃癌MGC803细胞经不同时间乏氧后,用2.5 g/L胰蛋白酶消化贴壁细胞,制成细胞悬液计算细胞数,每个样本收集等量细胞(5.0×10^6),参照美国Santa Cruz公司提供的方法提取蛋白质.以120 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,然后转印到硝酸纤维素膜上,取下硝酸纤维素膜后加入100 g/L脱脂奶粉封闭,分别加入一抗工作液鼠抗人VEGF mAb(Santa Cruz公司,工作浓度1:500)和鼠抗人EGFR mAb(福州迈新生物公司,即用型),4℃过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(兔抗鼠1:5 000稀释,北京中山公司),ECL发光试剂(北京中山公司)进行显像,应用ChemImage5500自动成像分析仪对蛋白条带进行灰度相对强度测定,得出积分灰度值,以积分值代表蛋白的表达量.

1.2.3 流式细胞仪分析 利用流式细胞仪分析MGC803细胞在不同乏氧时间后细胞周期的变化.取各组乏氧培养细胞,2.5 g/L胰酶消化后,4℃ PBS(0.1 μmol/L)吹成单细胞悬液,800 r/min离心8 min,4℃ PBS洗2次(800 r/min × 3 min),-20℃预冷700 mL/L乙醇4℃固定24 h,染色前800 r/min离心5 min,PBS重悬后800 r/min再离心5 min,弃上清,PBS 1 000 μL重悬,加RNA酶(10 g/L) 20 μL混匀后37℃作用40 min,800 r/min离心5 min,PBS重悬后800 r/min再离心5 min,洗去

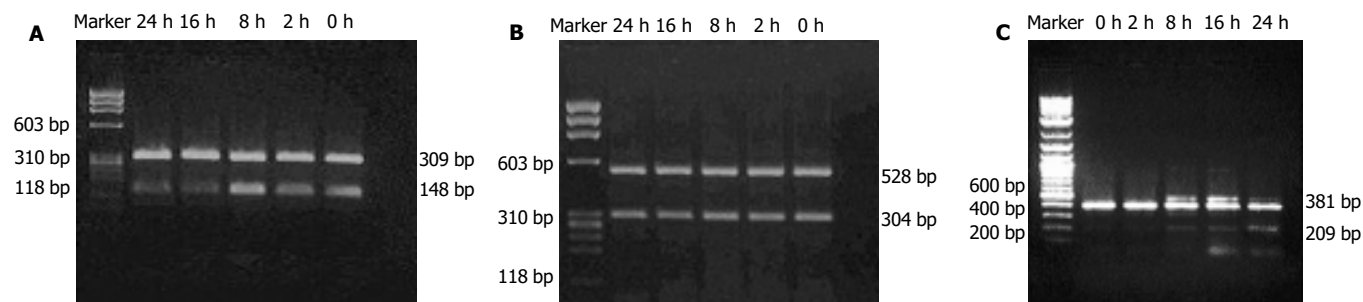


图1 MGC803 乏氧后 PTEN, mtATP6 和 mtCyt-b mRNA 表达. A: mtATP6 mRNA; B: mtCyt-b mRNA; C: PTEN mRNA.

RNA 酶, PBS 100 μ L 垂悬, 加 10 mg/L PI 染液 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 避光 30 min, 测定前用 400 目尼龙膜过滤标本, FACScan(Becton Dickinson, 美国)流式细胞仪于 488 nm 激发光测定细胞周期分布.

统计学处理 以 SPSS10.0 统计软件包进行 Spearman 二重变量非参数相关分析.

2 结果

2.1 PTEN, mtATP6 和 mtCyt-b mRNA 表达 PTEN mRNA 的表达水平随乏氧时间延长而增加, 至乏氧 24 h 达最高点; 乏氧开始后 mtATP6 mRNA 表达水平下降, 乏氧 8 h 后 mtATP6 mRNA 表达水平又升高, 以后随着时间的延长, mtATP6 mRNA 再次下降, 乏氧 24 h 后 mtATP6 mRNA 较乏氧前的表达水平下降一半; mtCyt-b mRNA 乏氧 8 h 出现一过性下降, 24 h 后又恢复到乏氧前水平 (表 1, 图 1A-C).

表1 MGC803 细胞乏氧后 mRNA 的表达

	乏氧时间 /h(%)				
	0	2	8	16	24
mtATP6/ β -actin	78.22	69.28	84.40	39.84	42.52
mtCyt-b/GAPDH	83.40	75.87	64.57	79.05	77.44
PTEN/ β -actin	23.93	26.52	35.74	40.31	49.92

2.2 MGC803 细胞乏氧后 VEGF, EGFR 蛋白表达 经 0, 2, 8, 16, 24 h 乏氧培养 MGC803 细胞 VEGF 蛋白相对含量分别为 16.1, 16.5, 18.2, 20.6, 27.5; EGFR 蛋白相对含量分别为 14.3, 17.2, 18.1, 32.6, 37.7. 结果显示 VEGF 蛋白的水平随乏氧时间延长而增加, 至乏氧培养的 24 h 达到最高. 乏氧在诱导 VEGF 蛋白表达的同时也增加了 EGFR 蛋白的表达 (图 2).

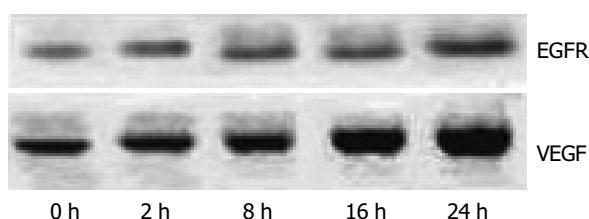


图2 MGC803 细胞乏氧后 VEGF, EGFR 蛋白的表达.

2.3 乏氧后 MGC803 细胞周期的改变 乏氧培养的 MGC803 细胞发生细胞周期 G_1 期阻滞, 随着时间延长, G_1 期阻滞逐渐增加, 16 h 达到高峰, 但 24 h 后, G_1 期恢复到乏氧前水平; 与 G_1 期相反, S 期细胞逐渐减少至 16 h 达最低, 24 h 后基本恢复至乏氧前水平, G_2/M 期细胞在乏氧后也表现为增加, 但总体变化不明显. 乏氧时间与 MGC803 细胞周期的改变无相关性 ($P > 0.05$, 表 2).

表2 MGC803 细胞乏氧后细胞周期的分布(mean \pm SD%, $n = 3$)

乏氧时间	G_1 期	G_2/M 期	S 期	凋亡细胞
0 h	59.12 \pm 0.98	12.35 \pm 0.58	26.52 \pm 1.56	2.01 \pm 0.10
2 h	62.58 \pm 1.91	13.64 \pm 0.93	21.42 \pm 1.09	2.36 \pm 0.08
8 h	65.67 \pm 1.02	15.45 \pm 2.97	11.86 \pm 1.38	7.02 \pm 0.55
16 h	70.12 \pm 2.45	15.79 \pm 0.90	10.23 \pm 1.20	2.38 \pm 0.57
24 h	60.93 \pm 1.64	14.07 \pm 1.40	21.86 \pm 0.51	3.14 \pm 0.14

3 讨论

乏氧对细胞有广泛的影响, 可导致 ATP 水平迅速下降; G_1 期细胞周期检测点被激活; DNA 复制被抑制, 蛋白质合成减慢, 分解增加, 但氧相关蛋白合成相对增加. 另外, 包括调节增生, 血管形成和死亡的信号传导途径被激活. 肿瘤细胞适应这些变化后, 在乏氧情况下存活甚至生长, 而肿瘤细胞的乏氧状态与预后不良和放射抵抗相关^[8]. MGC803 细胞乏氧后 PTEN mRNA、VEGF 和 EGFR 蛋白表达增加, ATP6 mRNA 表达下降, Cyt-b mRNA 变化不明显. 我们认为线粒体呼吸链上 mtCyt-b mRNA 的表达水平的一过性下降是细胞对乏氧的适应性调节, mtCyt-b 不是乏氧诱导的相关基因. 乏氧可激活丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated-protein-kinases, MAPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 等传导通路, 通过乏氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 的增加, 上调 VEGF 的表达^[9-10], 同时也会反馈性的引起 PTEN mRNA 表达水平的增高, 抑制 PI3K 通路的过度活化^[11]. 如果肿瘤细胞 PTEN 基因缺失或突变, 不能拮抗由乏氧引起的 PI3K 通路的激活, 使 VEGF 的表达持续升高^[12]. 乏氧早期导致了 mtATP6 mRNA 表达的下降, 但同时激活诱导 mtATP6 mRNA 表达的相关基因, 造成随后 mtATP6 mRNA 表达升高, 以后随着乏氧时间的延长, mtATP6

mRNA表达降至正常水平以下.组成mtATP合成酶质子膜通道部分的3个亚单位多肽(ATP6, ATP8和ATP9)由染色体基因组编码,其中mtATP6对维持线粒体基因组的稳定性起到重要作用^[13],长时间的乏氧会降低ATP6 mRNA的表达,影响染色体基因组的稳定性.另外,Chandel *et al*^[14]进一步研究表明染色体基因组在上调乏氧相关基因表达的过程中起到重要作用,由HIF-1 α 调控的乏氧诱导的一系列基因的表达需要线粒体的参与.祝亚平 *et al*^[15]将卵巢癌细胞系SKOV-3ipl乏氧培养后G₁期细胞阻滞,与本结果基本一致.在G₁期细胞增多的同时,G₂/M期及凋亡细胞也逐渐增多而S期细胞减少,这种变化仅发生于乏氧后2-16 h内,24 h后各细胞周期比例又恢复到有氧培养水平.我们推测在乏氧2-16 h内发生的细胞周期改变(主要为G₁期阻滞)只是细胞在乏氧条件下产生的适应性改变.

乏氧可以引起肿瘤细胞死亡/凋亡.在检测细胞周期前,我们通过倒置显微镜观察到随着乏氧时间的延长,漂浮细胞逐渐增多,16-24 h达高峰,这可能与乏氧诱导死亡及凋亡的信号传导途径被激活有关.我们用于检测细胞周期的细胞取材于乏氧后仍能贴壁的细胞,漂浮细胞已在收集前去除.结果显示随着乏氧时间的增加,凋亡细胞也逐渐增多,乏氧8 h时最高,以后慢慢回落.近年来的研究发现乏氧在诱导一部分肿瘤产生凋亡的同时,可以使另一部分肿瘤细胞对乏氧产生耐受,抗凋亡^[16],具体的生物学机制尚不清楚.有学者认为G₁期细胞对乏氧极度耐受,细胞周期的改变,特别是G₁期阻滞,曾被认为是肿瘤细胞逃避乏氧凋亡的重要机制,Kinoshita *et al*^[16]认为乏氧可诱导抗凋亡基因bcl-2的表达,从而获得凋亡抵抗.我们并未发现乏氧后G₁期细胞的改变与凋亡之间具有相关性.乏氧诱导相关基因和蛋白的表达以不同方式参与了肿瘤细胞对乏氧的适应过程,增强肿瘤细胞在乏氧环境下的生存能力^[17].我们的研究发现乏氧可增加PTEN mRNA的表达,增加乏氧诱导细胞凋亡的能力^[18],抑制肿瘤细胞的生长和增生,我们考虑乏氧诱导VEGF,EGFR蛋白的高表达,很可能就是引起乏氧细胞对放射抵抗的原因之一.乏氧是肿瘤发生恶性转化、促进肿瘤细胞的生长、浸润和转移等恶性生物学行为发生的始动因素^[19-22].

4 参考文献

- 1 Vaupel P, Kelleher BK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumor: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 2001;28(2 Suppl 8):29-35
- 2 Vaupel P, Hockel M. Hypoxia in cervical cancer: pathogenesis, characterization and biological/clinical consequences. *Zentralbl Gynakol* 2001;123:192-197
- 3 Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;

- 9:35-39
- 4 Kandel ES, Skeen J, Majewski N, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Feliciano CS, Gartel A, Hay N. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 2002;22:7831-7841
- 5 Wan XY, Shi YF, Li JQ. Inhibitory effect of tumor suppressor PTEN on cell growth of endometrial carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2004;26:275-278
- 6 Panigrahi AR, Pinder SE, Chan SY, Paish EC, Robertson JF, Ellis IO. The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *J Pathol* 2004; 204:93-100
- 7 Dagsgaard C, Taylor LE, O'Brien KM, Poyton RO. Effects of anoxia and the mitochondrion on expression of aerobic nuclear COX genes in yeast: evidence for a signaling pathway from the mitochondrial genome to the nucleus. *J Biol Chem* 2001; 276:7593-7601
- 8 Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47
- 9 Jiang YA, Fan LF, Jiang CQ, Zhang YY, Luo HS, Tang ZJ, Xia D, Wang M. Expression and significance of PTEN, hypoxia-inducible factor-1 alpha in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:491-494
- 10 Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000;60:1541-1545
- 11 Brader S, Eccles SA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis. *Tumori* 2004;90:2-8
- 12 Zhou YJ, Xiong YX, Wu XT, Shi D, Fan W, Zhou T, Li YC, Huang X. Inactivation of PTEN is associated with increased angiogenesis and VEGF overexpression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:3225-3229
- 13 Contamine V, Picard M. Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:281-315
- 14 Chandel NS, Schumacker PT. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol* 2000; 88:1880-1889
- 15 祝亚平, 丰有吉, 陈雅芳, 谢匡成. 卵巢癌细胞系SKOV3ipl缺氧与凋亡及其与细胞周期的关系. *中国癌症杂志* 2002;12:343-346
- 16 Kinoshita M, Johnson DL, Shatney CH, Lee YL, Mochizuki H. Cancer cells surviving hypoxia obtain hypoxia resistance and maintain anti-apoptotic potential under reoxygenation. *Int J Cancer* 2001;91:322-326
- 17 Stoeltzing O, McCarty MF, Wey JS, Fan F, Liu W, Belcheva A, Bucana CD, Semenza GL, Ellis LM. Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:946-956
- 18 Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 2004;9:667-676
- 19 Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 2000;36:1649-1660
- 20 Jogi A, Ora I, Nilsson H, Lindeheim A, Makino Y, Poellinger L, Axelsson H, Pahlman S. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2002;99: 7021-7026
- 21 黄耿文, 杨连粤. 缺氧致肿瘤恶性转化的分子机制. *世界华人消化杂志* 2001;9:1300-1304
- 22 Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibbain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000;60: 7075-7083

胃癌组织 *bcl-2* 基因表达与细胞凋亡和增生的关系

刘海峰, 刘为纹, 王国安, 滕小春, 陈刚, 汪兴伟, 何俊堂, 姜利国

刘海峰, 姜利国, 武警总医院消化科 北京市 100039
刘为纹, 王国安, 滕小春, 陈刚, 汪兴伟, 何俊堂, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化内科中心 重庆市 400038
刘海峰, 男, 1965-11-06 生, 河北省景县人, 汉族. 1988年毕业于第三军医大学, 1998年第三军医大学医学博士, 现为武警总医院消化科副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 主要从事胃癌的发病机制及其防治研究.
军队医药卫生“九五”重点课题资助项目, No. 96Z047
重庆市应用基础研究基金资助项目, No. 1998-06
项目负责人: 刘海峰, 100039, 北京市永定路 69 号, 武警总医院消化科. haifengliu333@hotmail.com
电话: 010-88276549
收稿日期: 2004-06-19 接受日期: 2004-07-27

Relationship between *bcl-2* gene expression and cell proliferation and apoptosis in human gastric carcinomas

Hai-Feng Liu, Wei-Wen Liu, Guo-An Wang, Xiao-Chun Teng, Gang Chen, Xing-Wei Wang, Jun-Tang He, Li-Guo Jiang

Hai-Feng Liu, Li-Guo Jiang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China
Wei-Wen Liu, Guo-An Wang, Xiao-Chun Teng, Gang Chen, Xing-Wei Wang, Jun-Tang He, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by Key Projects in the Ninth 5-year Plan of the Army medicine and sanitation No.96Z047, and Chongqing applied foundation research No.1998-06

Correspondence to: Dr. Hai-Feng Liu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, 69 Yongding Road, Beijing 100039, China. haifengliu333@hotmail.com
Received: 2004-06-19 Accepted: 2004-07-27

Abstract

AIM: To investigate the relationship between *bcl-2* gene expression levels in human gastric carcinoma and the frequency of tumor cell proliferation activity and apoptosis.

METHODS: *In situ* hybridization and immunohistochemistry methods were used to study the frequencies of expressions of *bcl-2* gene and nuclear antigen of proliferating cells (PCNA) in 53 gastric carcinomas. Meanwhile, an *in situ* apoptotic cell detection (TUNEL method) was adopted to compare the number of apoptotic cells and PCNA with the Bcl-2 protein expression in each case.

RESULTS: Of the 53 gastric carcinomas, 41 and 43 expressed *bcl-2* mRNA and Bcl-2 protein, which were count for 77.4% and 81.1% respectively. There was no significant difference between the positive rates obtained by these two methods. The apoptotic index of gastric carcinomas negatively related to PCNA index ($r = -0.993$, $P < 0.01$). With the increase of Bcl-2 protein expression, the cell proliferating activity increased but the apoptosis decreased in the tumor cells. Significant difference of cell proliferation and apoptosis existed between +++ group and ++ group of Bcl

-2 protein expression ($t = 2.552$, 2.699 , $P < 0.05$) as well as between the former two groups and the -, + group ($t = 4.487$, 3.975 , 2.807 , 3.094 , 4.885 , 5.816 , 3.404 , 3.895 , $P < 0.01$) respectively.

CONCLUSION: The overexpression of *bcl-2* gene inhibits cell apoptosis and excessive cell proliferation in the development and progress of gastric carcinomas.

Liu HF, Liu WW, Wang GA, Teng XC, Chen G, Wang XW, He JT, Jiang LG. Relationship between *bcl-2* gene expression and cell proliferation and apoptosis in human gastric carcinomas. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11):2543-2546

摘要

目的: 探讨胃癌细胞 *bcl-2* 基因表达水平与肿瘤细胞增殖活性及细胞凋亡程度的关系。

方法: 胃癌组织 53 例, 用原位杂交及免疫组化染色法分别检测 *bcl-2* mRNA, *bcl-2* 蛋白和增生细胞核抗原(PCNA)的表达, 并采用凋亡细胞原位检测方法对组织切片中的凋亡细胞进行观察和比较。

结果: 胃癌组织表达 *bcl-2* mRNA 41 例(77.4%), 表达 Bcl-2 蛋白 43 例(81.1%), χ^2 检验表明两种方法检测阳性率差异无显著性。胃癌 53 例增生期细胞标记物 PCNA 表达及凋亡细胞的阳性率均为 100%, 细胞凋亡和细胞增生指数呈显著性负相关($r = -0.993$, $P < 0.01$)。随胃癌细胞 Bcl-2 蛋白表达水平升高, PCNA 阳性细胞指数相应增加, 肿瘤凋亡细胞指数则相应减少, Bcl-2 蛋白 +++ 组与 ++ 组间($t = 2.552$, 2.699 , $P < 0.05$)及前两组分别与 - 组和 + 组间($t = 4.487$, 3.975 , 2.807 , 3.094 , 4.885 , 5.816 , 3.404 , 3.895 , $P < 0.01$)凋亡和增生细胞指数差异均有显著性。

结论: 胃癌细胞 *bcl-2* 基因高表达可引起细胞凋亡减少与过度增生。

刘海峰, 刘为纹, 王国安, 滕小春, 陈刚, 汪兴伟, 何俊堂, 姜利国. 胃癌组织 *bcl-2* 基因表达与细胞凋亡和增生的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(11): 2543-2546

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2543.asp>

0 引言

胃癌的发生发展不仅与肿瘤细胞的增生而且与其凋亡有密切关系^[1-10]。*bcl-2* 是细胞凋亡的重要调控基因, 已知 *bcl-2* 基因的异位和/或过度表达所致的细胞凋亡异常减少与多种肿瘤的发生发展密切相关^[11-14]。迄今,

*bcl-2*基因在胃癌前病变及胃癌中的表达状况及其与细胞凋亡和增生的关系已有少数文献报道。为进一步探讨胃癌细胞*bcl-2*基因表达水平与肿瘤细胞增生活性及细胞凋亡程度的关系,我们采用mRNA原位杂交和免疫组织化学染色技术从核酸转录、蛋白表达两个水平对胃癌组织中的*bcl-2*基因表达状况进行检测,并应用细胞凋亡原位检测方法和免疫组化染色对胃癌组织中细胞凋亡、增生的情况进行观察,探讨其与*Bcl-2*蛋白表达之间可能的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 我院1994/1996年胃远端癌手术切除标本53例,术前均未接受放疗或免疫治疗。每份标本的一半立即用冷冻包埋剂(OCT)包埋,液氮快速冷冻, -70°C 冰箱保存。另一半组织标本经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,并经HE染色病理诊断证实。原位杂交前,将冷藏标本取出复温至 -23°C ,用恒冷切片机做6 μm 连续冷冻切片,室温干燥10 min, -70°C 保存备用。PCNA及*bcl-2*单克隆抗体均购自Santa Cruz公司;S-P免疫染色试剂盒购于福建迈新生物工程公司;地高辛标记及检测试剂盒以及细胞凋亡原位检测试剂盒均为Boehringer Mannheim公司产品。*bcl-2*寡核苷酸探针由中科院上海生物工程研究中心合成。探针序列为:5'-GGGAAACACCAGAATCAAGT-3'。探针标记按试剂盒说明进行,探针标记后分别作探针显色灵敏度及杂交灵敏度检测。

1.2 方法

1.2.1 原位杂交 所用载玻片和盖玻片经认真清洗,高压消毒,载玻片上涂多聚赖氨酸(1 g/L),室温干燥,石蜡组织直接贴于载玻片上, 65°C 烤片3 h,二甲苯脱蜡,乙醇逐级入水后,用100 mg/L蛋白酶K消化, 37°C 20 min;4 mL/L多聚甲醛后固定5 min,依次用2 \times SSC、三蒸水处理后,乙醇逐级脱水;滴加预杂交液(500 mL/L甲酰胺;6 \times SSC,5 mL/L SDS,5 \times Danhardt溶液:聚乙烯吡咯烷酮1 g/L,牛血清白蛋白1 g/L,水溶性聚蔗糖-400 1 g/L,200 mg/L ssDNA), 42°C 预杂交2 h,吸弃载玻片上预杂交液,每片滴加50 μL 杂交液,置于湿盒中 42°C 杂交过夜。杂交后按下述程序严格冲洗:0.1 mL/L SDS 2 \times SSC 42°C 10 min 2次,500 mL/L甲酰胺 2 \times SSC室温10 min 2次,500 mL/L甲酰胺0.5 \times SSC室温10 min 2次,0.2 \times SSC室温5 min 1次,0.1 \times SSC室温2 min 1次。然后按试剂盒说明进行显色,结果满意后水洗终止,封片。除阳性对照外,设无探针阴性对照及RNase处理后的阴性对照。

1.2.2 免疫组化染色和TUNEL染色 石蜡切片常规脱蜡、水化,继以免疫组化试剂盒检测,染色程序按SP法操作常规进行,抗PCNA及*bcl-2*单抗1:100稀释。以PBS替代一抗作为空白对照,正常血清替代一抗作为替代对照。用已知阳性切片作为阳性对照。石蜡切片

脱蜡,逐级入水,蛋白酶K(20 mg/L) 37°C 消化20 min, PBS(pH7.4)洗5 min,3次;滴加TUNEL反应液 37°C 孵育1 h, PBS洗5 min,3次;滴加抗荧光素抗体-过氧化物酶联结构物 37°C 30 min, PBS洗5 min,3次;DAB显色,苏木素复染,封片。阴性对照设以PBS替代TUNEL反应液的空白对照,阳性对照切片经DNaseI预处理10 min,再接上述染色步骤。光镜下观察TUNEL染色及PCNA免疫组化染色切片的显色反应,数5个以上高倍视野,不少于500个细胞,计数阳性细胞数,分别作为TUNEL阳性细胞(凋亡细胞)指数及PCNA阳性细胞(增生细胞)指数。用上述同样方法计数*bcl-2* mRNA和*Bcl-2*蛋白阳性肿瘤细胞数,将其分为4个等级:-,无阳性细胞;+,阳性细胞 $<25\%$;++,阳性细胞占25-50%;+++,阳性细胞 $>50\%$ 。

统计学处理 采用 χ^2 检验、*t*检验和相关分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 *bcl-2* mRNA及其蛋白在胃癌组织中的表达 *bcl-2* mRNA原位杂交阳性信号为紫蓝色或棕蓝色颗粒,主要集中在胞质内(图1A)。*Bcl-2*蛋白免疫组化阳性信号呈棕黄色颗粒,位于细胞质内和/或细胞膜上,未见核内表达(图1B)。在53例胃癌中,有41例(77.4%)不同程度地表达*bcl-2* mRNA,*Bcl-2* mRNA-、+、++、+++者分别占22.6%(12/53),11.3%(6/53),37.7%(20/53)和28.3%(15/53)。不同程度地表达*Bcl-2*蛋白43例(81.1%),*Bcl-2*蛋白-、+、++、+++者分别占18.9%(10/53),11.3%(6/53),39.6%(21/53)和30.2%(16/53)。经四格表 χ^2 检验表明,原位杂交及免疫组化两种方法对*Bcl-2*基因表达检测结果一致性非常显著($P<0.01$),53例标本中两种方法检测结果一致者占86.8%(46/53),同时发现两种方法的差异则未达到显著界限($P>0.05$)。

2.2 胃癌组织细胞凋亡和细胞增生及其与*Bcl-2*蛋白表达的关系 TUNEL染色阳性反应物质呈棕黄色,位于细胞核内,浓缩的核质紧贴于核膜,或核质呈现均匀的染色,凋亡细胞呈弥漫性、簇状和/或散在分布(图1C);未凋亡细胞非特异性染色极浅,而坏死组织染色呈片状,细胞轮廓不清,染色呈均一深染的棕黄色斑片。PCNA染色阳性物质呈棕黄色颗粒状均匀分布,主要位于细胞核内,PCNA阳性细胞在胃癌组织中呈弥漫性分布(图1D)。53例胃癌细胞凋亡和PCNA表达的阳性率均为100%,细胞凋亡指数为5.8%,PCNA指数为47.5%,直线相关分析证实二者间呈显著性负相关($r=-0.993$, $P<0.01$)。PCNA阳性指数随肿瘤细胞*Bcl-2*蛋白表达水平升高而相应增加,肿瘤细胞凋亡指数随肿瘤细胞*Bcl-2*蛋白表达水平升高而相应减少,除*Bcl-2*蛋白-组与+组间无统计学差异外,其余各组间PCNA和肿瘤细胞凋亡指数的差异均有显著性,见表1。经连续切片观察,*Bcl-2*蛋白表达与细胞凋亡和PCNA阳性细胞在多数病例具有同域性。

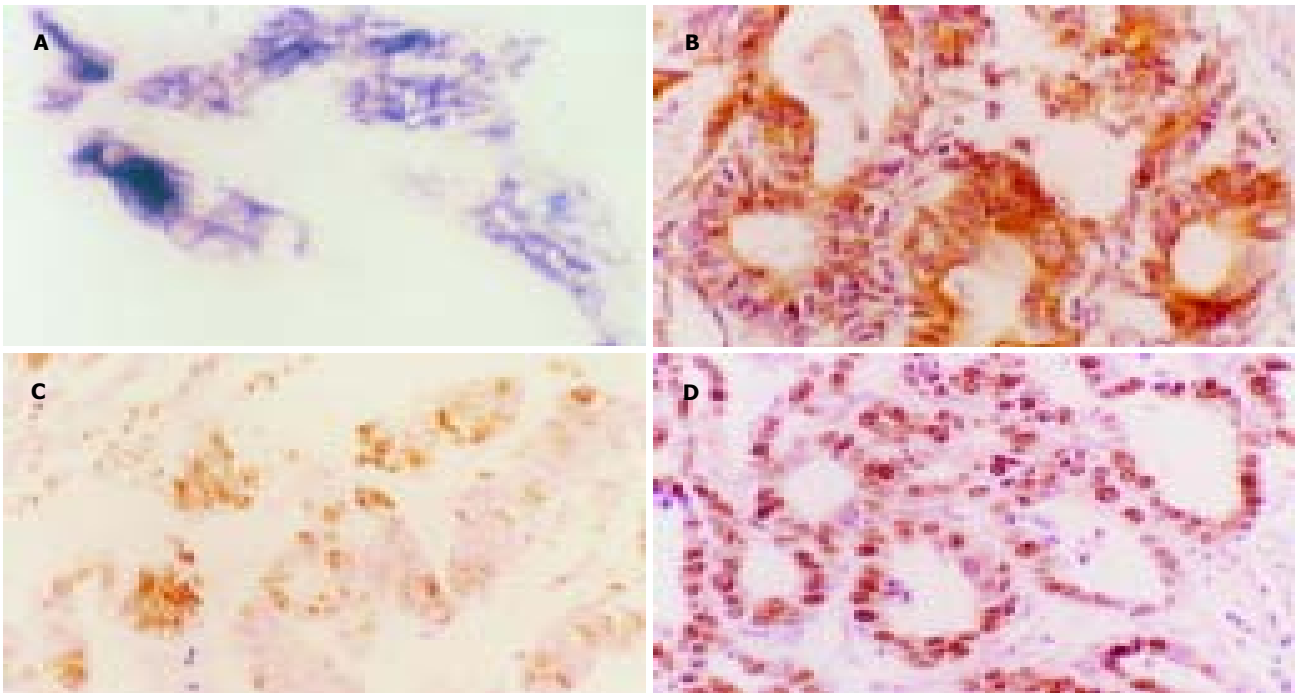


图1 胃癌组织 *bcl-2* 基因表达、凋亡细胞和增生细胞的检测结果.A: 胃癌组织 *bcl-2* mRNA 阳性,ISH × 200; B: 胃癌组织 Bcl-2 蛋白阳性, SP × 200; C: 胃癌组织凋亡细胞呈簇状分布, TUNEL × 200; D: 胃癌组织 PCNA 阳性细胞呈弥漫性分布, SP × 200.

表1 胃癌 *Bcl-2* 蛋白表达与细胞凋亡和增生的关系(% , mean±SD)

<i>Bcl-2</i> 蛋白表达	<i>n</i>	凋亡指数	PCNA 指数
-	10	8.7 ± 3.3	35.4 ± 8.3
+	6	7.9 ± 2.1	36.5 ± 9.0
++	21	5.2 ± 2.0 ^b	49.9 ± 12.1 ^b
+++	16	3.6 ± 1.8 ^{ab}	62.5 ± 15.4 ^{ab}

^a*P*<0.05 vs *Bcl-2* 蛋白 ++ 组; ^b*P*<0.01 vs *Bcl-2* 蛋白 - 和 + 组.

3 讨论

bcl-2 基因是 Tsujimoto *et al* 在 1985 年研究人滤泡性非霍奇金淋巴瘤患者染色体t (14; 18)易位时发现的一个基因, 编码两个结构相近的蛋白质片段: Bcl-2 α(26 000) 和 Bcl-2 β(21 000). 正常情况下 Bcl-2 基因定位于人染色体 18q21, 其编码产物 Bcl-2 蛋白可通过拮抗野生型 p53 蛋白的促凋亡作用, 将 *c-myc* 蛋白由促凋亡逆转为抑制凋亡及阻断 caspase 酶类活化的上游信号传递通路等作用抑制多种因素诱发的细胞凋亡, 参与细胞增生和凋亡动态平衡的调控^[15-17]. *bcl-2* 基因表达异常增加可使已有基因异常改变的细胞逃避凋亡, 由此引起的基因异常事件的累积是导致细胞转化和肿瘤形成的必要前提. Bcl-2 蛋白对细胞凋亡具有直接调节的作用, 能够抑制许多因素引起的细胞凋亡, 但并不能刺激增生, 而是促进非增生细胞的存活^[18-19]. 研究发现, Bcl-2 不仅存在于 T 及 B 淋巴细胞, 在未成熟的造血细胞、上皮细胞、神经细胞及多种癌细胞中均有表达^[20-22]. 我们发现, 53 例胃癌组织中 *bcl-2* mRNA 和蛋白的阳性率分别为 77.4% 和 81.1%, *bcl-2* 蛋白与 *bcl-2* mRNA 检测结果呈显著性正相关, 提示胃癌细胞普遍存在 Bcl-

2 蛋白翻译及核酸转录水平的过度表达, *bcl-2* 基因异常表达可能与胃癌的发生、发展及浸润性生长能力的获得密切相关.

我们既往的研究工作已经证实, 胃黏膜癌变过程中不仅存在活跃的细胞增生, 而且存在细胞凋亡的异常, 细胞过度增生和(或)细胞凋亡减少是胃癌发生的生物学基础^[23-30]. 但胃黏膜癌变过程中细胞凋亡和增生异常的机制尚不明确, 可能与细胞凋亡相关基因调控失常有关. 本组 53 例胃癌增生期细胞标记物 PCNA 表达及凋亡细胞的阳性率均为 100%, 细胞凋亡和细胞增生指数呈显著性负相关. 随胃癌细胞 Bcl-2 蛋白表达水平升高, PCNA 阳性指数相应增加, 肿瘤细胞凋亡指数则相应减少, 除 Bcl-2 蛋白 - 组与 + 组间外, 其余各组间 PCNA 和肿瘤细胞凋亡指数的差异均有显著性. 研究结果提示, *bcl-2* 基因表达异常增加可抑制胃癌细胞凋亡, 抑制强度随胃癌细胞 *bcl-2* 基因表达水平升高而相应增加. 虽然 *bcl-2* 基因表达异常增加可能不是胃癌细胞过度增生的直接原因, 但二者之间的协同作用可引起细胞无限蓄积, 并在胃癌发生及发展过程中起重要作用.

4 参考文献

- 1 Jang TJ, Kim JR. Proliferation and apoptosis in gastric epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 2000;35:265-271
- 2 Zhang Z, Yuan Y, Gao H, Dong M, Wang L, Gong YH. Apoptosis, proliferation and p53 gene expression of *H pylori* associated gastric epithelial lesions. *World J Gastroenterol* 2001;7:779-782
- 3 Chan AO, Wong BC, Lam SK. Gastric cancer: past, present and future. *Can J Gastroenterol* 2001;15:469-474
- 4 Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002;2:28-37

- 5 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burji I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
- 6 Ebert MP, Leodolter A, Malfertheiner P. Novel strategies in the prevention of gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001; 48:1569-1571
- 7 El-Omar EM, Chow WH, Rabkin CS. Gastric cancer and *H. pylori*: Host genetics open the way. *Gastroenterology* 2001; 121:1002-1004
- 8 Maeda S, Yoshida H, Mitsuno, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Omata M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002;50:771-778
- 9 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 10 Hamajima N, Matuo K, Watanabe Y, Suzuki T, Nakamura T, Matsuura A, Yamao K, Tominaga S. A pilot study to evaluate stomach cancer risk reduction by *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Gastroenterol* 2002;97:764-765
- 11 Yan J, Xu YH. Tributyrin inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest. *World J Gastroenterol* 2003;9:660-664
- 12 Zhou HB, Zhu JR. Paclitaxel induces apoptosis in human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:442-445
- 13 Chen YX, Zhong XY, Qin YF, Bing W, He LZ. 15d-PGJ2 inhibits cell growth and induces apoptosis of MCG-803 human gastric cancer cell line. *World J Gastroenterol* 2003;9:2149-2153
- 14 Xu AH, Chen HS, Sun BC, Xiang XR, Chu YF, Zhai F, Jia LC. Therapeutic mechanism of ginkgo biloba exocarp polysaccharides on gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2424-2427
- 15 Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58
- 16 Liu JR, Chen BQ, Yang YM, Wang XL, Xue YB, Zheng YM, Liu RH. Effect of apoptosis on gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 induced by cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid. *World J Gastroenterol* 2002;8:999-1004
- 17 Zhao AG, Zhao HL, Jin XJ, Yang JK, Tang LD. Effects of Chinese Jianpi herbs on cell apoptosis and related gene expression in human gastric cancer grafted onto nude mice. *World J Gastroenterol* 2002;8:792-796
- 18 Liu S, Wu Q, Ye XF, Cai JH, Huang ZW, Su WJ. Induction of apoptosis by TPA and VP-16 is through translocation of TR3. *World J Gastroenterol* 2002;8:446-450
- 19 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF-kB, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435
- 20 Heckman CA, Mehew JW, Boxer LM. NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene* 2002; 21:3898-3908
- 21 Gobe G, Rubin M, Williams G, Sawczuk I, Buttyan R. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Invest* 2002;20:324-332
- 22 Satomi D, Takiguchi N, Koda K, Oda K, Suzuki H, Yasutomi J, Ishikura H, Miyazaki M. Apoptosis and apoptosis-associated gene products related to the response to neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer. *Int J Oncol* 2002;20:1167-1171
- 23 Sun WH, Yu Q, Shen H, Ou XL, Cao DZ, Yu T, Qian C, Zhu F, Sun YL, Fu XL, Su H. Roles of *Helicobacter pylori* infection and cyclooxygenase-2 expression in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004;10:2809-2813
- 24 De Luca A, Iaquinto G. *Helicobacter pylori* and gastric diseases: a dangerous association. *Cancer Lett* 2004;213:1-10
- 25 Yang GF, Deng CS, Xiong YY, Gong LL, Wang BC, Luo J. Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: association with *Helicobacter pylori* cagA (+) infection. *World J Gastroenterol* 2004;10:491-496
- 26 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Yang SM, Wang RQ. Bax gene expression and its relationship with apoptosis in human gastric carcinoma and paracancerous tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:665-668
- 27 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Men RP. Expression and significance of proapoptotic gene Bax in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:15-17
- 28 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 高晋华, 王振华. 幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞凋亡和增生与 p53 基因表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:1265-1268
- 29 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 幽门螺杆菌感染与胃癌前病变演化的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:912-915
- 30 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 根除幽门螺杆菌对胃癌前病变组织中 bax 蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003; 11:22-24

胃癌组织中生长抑素及其受体的表达及与Ki67的相关性

李秋萍, 李红梅, 王全红

李秋萍, 李红梅, 山西医科大学汾阳学院护理系 山西省汾阳市 032200
王全红, 山西省肿瘤医院病理科 山西省太原市 030001
李秋萍, 女, 1966-11-1 生, 山西省霍州市人, 汉族. 1994 年山西医科大学
硕士, 副教授. 主要从事胃肠激素与消化系统疾病关系的研究.
山西省青年科技基金资助课题, No. 20011033
山西省留学回国人员资助课题, No. 2002
项目负责人: 李秋萍, 032200, 山西省汾阳市, 山西医科大学汾阳学院护理
系. liqp@163.com
电话: 0358-7237201 传真: 0358-7237170
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-09-24

Expression of somatostatin and its receptor and their relationship with Ki67 in gastric carcinoma

Qiu-Ping Li, Hong-Mei Li, Quan-Hong Wang

Qiu-Ping Li, Hong-Mei Li, Nursing Department of Fenyang College, Shanxi
Medical University, Fenyang 032200, Shanxi Province, China
Quan-Hong Wang, Department of Pathology, Shanxi Provincial Tumor
Hospital, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Supported by Youth Science and Technology Foundation of Shanxi
Province, No. 20011033; and Returned Scholarship of Shanxi
Province, No. 2002
Correspondence to: Qiu-Ping Li, Nursing Department, Fenyang Col-
lege of Shanxi Medical University, 16 Yingxiongbei Road, Fenyang
032200, Shanxi Province, China. liqp@163.com
Received: 2004-08-16 Accepted: 2004-09-24

Abstract

AIM: To study the role of somatostatin (SS), its receptors (SSTR-1, SSTR-2) and Ki67 in the process of gastric carcinogenesis and their relationship.

METHODS: Two-step immunohistochemical staining was used to examine the expression of SS, SSTR-1, SSTR-2 and Ki67 in 100 cases of gastric specimens, of which there were 60 gastric carcinoma (GC) tissues, 12 gastric severe atypical hyperplasia (GSAH) tissues, and 28 normal gastric (NG) tissues. The expression was scored according to the percentage of pigmented cell. Kruskal Wallis test, rank sum test and rank correlation analysis were used to examine the significance.

RESULTS: There were significant differences of SSTR-1, SSTR-2 and Ki67 expression among three different gastric specimens (SSTR-1: $\chi^2 = 9.11$, $P = 0.011 < 0.05$; SSTR-2: $\chi^2 = 9.99$, $P = 0.007 < 0.05$; Ki67: $\chi^2 = 35.76$, $P = 0.000 < 0.05$); SS expression in GC group had a decreased tendency when compared to those in any other two groups; in GSAH group, SSTR1 expression significantly increased than those in GC group and NG group (average rank = 25.37, 23.47 respectively, $P < 0.05$); SSTR-2 expression in GC group was significantly higher than that in NC group (average rank = 11.96, $P < 0.05$); Ki67 expression increased significantly in both GC and GSAT group when compared with that in NG group (average rank = 37.65,

23.68; $P < 0.01$, $P < 0.05$ respectively). In GC group, the expression of SS, SSTR-1, SSTR-2 and Ki67 was not related to differential degree, UICC stage, local lymph node metastasis, and depth of invasion; however, the poorer the differential degree, the lower the SS expression. There were positive correlations among the expression of Ki67 with that of SS, SSTR-1 and SSTR-2 in different groups ($P < 0.01$).

CONCLUSION: SS, SSTR-1, SSTR-2 and Ki67 correlates with each other in the process of gastric carcinogenesis and may serve as useful markers for assessing the biological behavior of gastric carcinoma.

Li QP, Li HM, Wang QH. Expression of somatostatin and its receptor and their relationship with Ki67 in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11):2547-2550

摘要

目的: 探讨生长抑素(SS)及其受体(SSTR-1, SSTR-2)和 Ki67 在胃癌发生、发展中的作用及其相关性。

方法: 对病理确诊的 100 例胃组织标本, 其中胃良性组织 (NG, 28 例)、重度不典型增生 (GSAH, 12 例) 及胃癌 (GC, 60 例), 采用免疫组化二步法进行 SS、SSTR-1、SSTR-2 和 Ki67 染色. 染色后按着色细胞百分数进行评分判定. 用 Kruskal Wallis 检验、秩和检验及等级相关分析进行统计学处理。

结果: SSTR-1, SSTR-2 和 Ki67 在三种组织中的表达存在显著性差异 (SSTR-1: $\chi^2 = 9.11$, $P = 0.011$, SSTR-2: $\chi^2 = 9.99$, $P = 0.007$, Ki67: $\chi^2 = 35.76$, $P = 0.000$); SS 在胃癌组织中的表达较其余两组有降低趋势; SSTR-1 在胃重度不典型增生组织中的表达与其余两组间存在显著性差异 (GSAH vs GC, 平均秩 = 25.37, $P < 0.05$, GASH vs NG, 平均秩 = 23.47, $P < 0.05$); SSTR-2 在胃癌组织与胃良性组织中存在显著性差异 (平均秩 = 11.96, $P < 0.05$); Ki67 在胃良性组织中的表达与胃癌组织和胃重度不典型增生组织比较均存在显著性差异 (GC vs NG, 平均秩 = 37.65, $P < 0.01$, GASH vs NG, 平均秩 = 23.68, $P < 0.05$). 胃癌 SS, SSTR-1, SSTR-2 和 Ki67 的表达与胃癌分化类型、胃癌分期、是否伴有浆膜浸润及淋巴结转移不同组间均无显著性差异; 但 SS 胃癌分化差者, SS 表达降低. 除在胃重度不典型增生组织中 Ki67 与 SS 无相关外, Ki67 与各指标间在各种组织中的表达均存在显著正相关 ($P < 0.01$).

结论: SS, SSTR-1, SSTR-2 和 Ki67 在胃癌的发生、发

展中相互作用,可作为胃癌的生物学行为指标。

李秋萍, 李红梅, 王全红. 胃癌组织中生长抑素及其受体的表达及与Ki67的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2547-2550

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2547.asp>

0 引言

胃癌是严重危害人类健康最常见的癌症之一, 占我国癌发病和死亡率之首, 且有逐年上升趋势, 因而探讨胃癌的发生发展机制具有重要的意义. 研究表明, 生长抑素(somatostatin, SS)对胃肠肿瘤细胞的生长具有抑制作用^[1-3], 胃癌组织中存在SS受体(SSTR)^[4-5]. 但SS及其SSTR在胃癌组织中表达的意义、以及与其他具有调节细胞生长作用的因子如Ki67的相互关系尚不十分清楚. 我们采用免疫组化二步法, 在同一切片上显示SS, SSTR-1, SSTR-2和Ki67, 探讨了各指标的表达与胃癌部位、分化、分期、淋巴结转移和浆膜浸润等的关系如下。

1 材料和方法

1.1 材料 胃组织石蜡包埋组织100例取自山西省肿瘤医院病理科, 其中胃癌组织(男39例, 女21例, 年龄31-80(平均59岁)60例, 胃良性组织(男19例, 女9例, 年龄31-73(平均56岁)28例, 胃重度非典型增生组织(男7例, 女5例, 年龄44-72(平均57岁)12例. 良性组织取自距肿瘤5 cm以外. 所有的组织均行病理组织学检查确诊. 胃癌分化好组36例(乳头状腺癌4例、管状腺癌32例); 分化差组24例(低分化腺癌11例, 黏液腺癌9例, 印戒细胞癌3例, 未分化癌1例); I b期4例, II期18例, III a期28例, III b期6例, IV期4例. 兔抗人SS多抗, 兔抗人SSTR-1多抗, 鼠抗人Ki67单抗均购自福州迈新生物技术开发有限公司. 兔抗人

SSTR-2多抗购自武汉博士德生物工程有限公司.

1.2 方法 采用免疫组化二步法在同一切片上进行SS, SSTR-1 SSTR-2和Ki67染色. 将100例标本按13×8制作成组织芯片. 常规切成4 μm的石蜡切片. 脱蜡、水化组织切片; 30 mL/L过氧化氢孵育5 min, 以阻断内源性过氧化物酶; 根据所应用的一抗的特殊要求, 对组织切片进行预处理; 滴加小鼠(或兔)来源的一抗, 室温30-60 min, PBS或TBS冲洗, 2 min×3; 滴加山羊抗小鼠(或兔)IgG抗体-HRP多聚体, 20 min, PBS或TBS冲洗, 2 min×3; 应用DAB溶液染色; 蒸馏水冲洗、复染、脱水、封片. SS, SSTR-1, SSTR-2, Ki67染色阳性均呈棕黄色, SS阳性位于胞质和核膜上. SSTR-1, SSTR-2阳性主要在胞质中, 呈颗粒状. 评分按着色细胞百分数判定, Ki67: 0分: 阴性(-)阳性细胞数<10%, 1分: 弱阳性(+)阳性细胞数10-25%, 2分: 中等阳性(++)阳性细胞数25-70%, 3分: 强阳性(+++)阳性细胞数>70%. 其余各项指标评分标准为: 0分: 阴性(-)未见阳性细胞, 1分: 弱阳性(+)阳性细胞数<25%, 2分: 中等阳性(++)阳性细胞数25-50%, 3分: 强阳性(+++)阳性细胞数>50%.

统计学处理 Kruskal Wallis 检验、秩和检验及等级相关分析. $P<0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 胃癌SS, SSTR-1, SSTR-2和Ki67的表达 除SS外, SSTR-1, SSTR-2和Ki67在3种组织中的表达存在显著性差异($P<0.01$, 表1). 若以1, 2, 3为阳性合并计算则可发现, SS在胃癌组织、胃重度不典型增生组织、胃良性组织的阳性表达率分别为33.3%, 58.3%, 57.1%, 即SS在胃癌组织中的表达较其余两组有降低趋势. 对SSTR-1, SSTR-2和Ki67在3种组织中的两两比较结果显示(表2): SSTR-1在胃重度不典型增生组织

表1 SS, SSTR-1, SSTR-2和GAS在胃癌组织中的表达

分组	n	SS					SSTR-1					SSTR-2					Ki67				
		0	1	2	3	X	0	1	2	3	X	0	1	2	3	X	0	1	2	3	X
N1	60	40	9	8	3	46.3	33	12	9	6	46.9	42	8	8	2	55.7	12	20	18	10	62.7
N2	28	12	10	2	4	57.5	16	2	6	4	48.8	26	2	0	0	43.7	24	4	0	0	25.1
N3	12	5	6	0	1	55.1	2	1	5	4	72.3	12	0	0	0	40.5	3	8	1	0	48.8

N1: 胃癌组织; N2: 胃良性组织; N3: 胃重度不典型增生组织; X: 平均秩。

表2 SSTR-1, SSTR-2和Ki67表达中的两两比较

分组比	SSTR-1		SSTR-2		Ki67	
	平均秩	P	平均秩	P	平均秩	P
N1与N2	1.9	>0.05	11.96	<0.05	37.65	<0.01
N1与N3	25.37	<0.05	15.17	>0.05	13.97	>0.05
N2与N3	23.47	<0.05	3.21	>0.05	23.68	<0.05

N1: 胃癌组织; N2: 胃良性组织; N3: 胃重度不典型增生组织

表3 胃癌部位与 SS, SSTR-1, SSTR-2 和 Ki67 的表达

部位	<i>n</i>	SS				SSTR-1				SSTR-2				Ki67			
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
胃窦	9	5	2	1	1	7	1	0	1	6	1	1	1	2	2	5	0
胃体	15	10	5	0	0	5	6	4	0 ^b	10	3	2	0	5	2	5	3
贲门	36	25	2	7	2	21	5	5	5	26	4	5	1	5	16	8	7

^b $P < 0.01$ vs 其余两部位, 秩和检验.

表4 SS, SSTR-1, SSTR-2 和 Ki67 表达与胃癌临床病理参数的关系

组别	<i>n</i>	SS				SSTR-1				SSTR-2				Ki67			
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
分化类型: 差	24	14	5	4	1	12	6	4	2	17	4	3	0	6	9	5	4
好	36	26	4	4	2	21	6	5	4	25	4	5	2	6	11	13	6
胃癌分期: I+II	22	16	2	2	2	11	3	3	5	13	3	5	1	3	9	8	2
III+IV	38	24	7	6	1	22	9	6	1	29	5	3	1	9	11	10	8
浆膜浸润: 有	15	10	2	2	1	8	4	3	0	12	2	1	0	5	5	3	2
无	45	30	7	6	2	25	8	6	6	30	6	7	2	7	15	15	8
淋巴结转移: 有	50	33	9	6	2	27	10	8	5	37	6	6	1	12	16	14	8
无	10	7	0	2	1	6	2	1	1	5	2	2	1	0	4	4	2

表5 Ki67 与 SS, SSTR-1, SSTR-2 的相关分析

两两相关	胃癌组织		胃良性组织		重度不典型增生	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Ki67-SS	0.793	0.000	0.649	0.000	-	-
Ki67-SSTR-1	0.903	0.000	0.768	0.000	0.772	0.003
Ki67-SSTR-2	0.766	0.000	0.679	0.000	0.821	0.001

中的表达与其余两组间存在显著性差异($P < 0.05$); SSTR-2在胃癌组织与胃良性组织中存在显著性差异($P < 0.05$); Ki67在胃良性组织中的表达与其余两组间均存在显著性差异, 与胃癌组织比较 $P < 0.01$, 与胃重度不典型增生组织比较 $P < 0.05$.

2.2 胃癌部位与 SS, SSTR-1, SSTR-2 和 Ki67 表达 SSTR-1在胃体胃癌明显高于其余两组($P < 0.01$). 若以1, 2, 3为阳性合并计算则可发现, SS在胃窦、胃体和胃底贲门的阳性表达率分别为44.4%, 33.3%, 30.5%(表3).

2.3 SS, SSTR-1, SSTR-2 和 Ki67 表达与胃癌临床病理参数的关系 各指标在胃癌分化类型、胃癌分期、是否伴有浆膜浸润及淋巴结转移不同组间均无显著性差异. 但若以1, 2, 3为阳性合并计算则可发现, SS在胃癌分化好组 and 分化差组的阳性表达率分别为41.6%, 27.7%, 也即分化差者, SS表达率低(表4).

2.4 Ki67 与 SS, SSTR-1, SSTR-2 的相关分析 除在胃重度不典型增生组织中 Ki67 与 SS 无相关外, Ki67 与各指标间在各种组织中的表达均存在显著正相关($P < 0.01$, 表5).

3 讨论

生长抑素(SS)分布广泛, 作用多样, 消化道是其主要的的作用部位之一. SS的生物学作用主要是通过与其细胞表面的 SS 受体(SSTR)结合, 继而活化受体后信号转导通路而产生的. 目前已发现并克隆、鉴定出5种亚型^[6-9], 按发现的顺序分别命名为 SSTR1-5. 研究表明, SSTR-1 和 SSTR-2 介导 SS-14 和其类似物 RC160 对细胞生长的抑制作用, 且该作用可能与酪氨酸磷酸酶活性增高有关. SSTR-2与胃酸分泌、组织胺及胃泌素的释放等关系密切^[9]. 胃癌组织不仅分泌 SS, 而且表达 SSTR, 这在许多的基础和临床实验中得到证实^[1-4]. 本结果显示, 胃癌组织 SS 表达较胃良性组织和胃重度不典型增生组织有降低趋势; 分化差的胃癌组较分化好组的 SS 表达有降低趋势. 以上结果虽无统计学差异, 但亦可提示胃癌组织的分化程度与 SS 水平有一定的关联: 即胃癌分化程度越差, SS 表达水平越低. 推测可能与 SS 的抑制肿瘤作用有关. 我们还发现 SS 表达在胃底贲门癌较胃窦癌和胃体癌有降低趋势, 这可能是贲门癌患者手术后容易复发, 生存期短的原因之一, 因 SS 低表达可导致 SS 对

肿瘤演进过程中调控作用减弱. SS表达与胃癌分期、浆膜浸润、淋巴结转移等无关.

我们发现,胃重度不典型增生组织SSTR-1表达升高,胃癌组织SSTR-2的表达升高.由于SSTR-1和SSTR-2介导SS-14和其类似物RC160对细胞生长的抑制作用,因而推测在胃癌进展中两种受体均对胃癌的发生、发展有调控作用,只是在病变早期可能是SSTR-1介导为主,而在晚期则以SSTR-2介导为主.

Ki67是应用最广泛的增生细胞标记之一.研究发现,Ki67有可能作为确定癌前人群高危个体的生物标志物^[10].目前对Ki67与胃癌关系的研究报道较少,且对其意义尚存在争议^[11-12].我们的研究表明,Ki67表达在胃癌及胃重度不典型增生时的表达均显著高于胃良性组织,因而检测Ki67表达有助于胃癌的早期诊断.但进一步分析表明,Ki67表达与胃癌部位、胃癌分化程度、分期、浆膜浸润、淋巴结转移等无关,这与的结果相一致.细胞癌变是多基因多步骤的复杂过程,涉及许多调控生长因子,包括癌基因、抑癌基因、生长因子以及肿瘤病毒等细胞本身或外来因素的作用.Ki67是与肿瘤增生活性密切相关的重要因素,而SS及受体则主要有抑制肿瘤生长的作用.国内外尚未发现有对Ki67与SS,SSTR-1,SSTR-2等在胃癌时同时研究,并进行相关分析的报道.研究结果显示,Ki67与SS,SSTR-1,SSTR-2间存在明显正相关关系,由于Ki67在胃重度不典型增生组织中即有显著增加,因而推测SS,SSTR-1,SSTR-2的变化可能与Ki67的高表达有关,SSTR-1,SSTR-2在胃重度不典型增生和胃癌组织中的高表达有可能代偿性地增加SS对细胞生长的抑制作用.有关二者在胃癌发生、发展中的确切关系和生物化学机制,还有待进一步探讨.

致谢: 山西省肿瘤医院病理科全体同仁的帮助;山西医科大学汾阳学院统计学教研室张兴教授、高淑红老师,护理学系杨黑女老师的支持.

4 参考文献

- 1 王消冰,王绪,张南征.生长抑素与胃癌.世界华人消化杂志 2001;9:1185-1189
- 2 Kwekkeboom DJ, Krenning EP. Somatostatin receptor imaging. *Semin Nucl Med* 2002;32:84-91
- 3 Hofland LJ, Lamberts SW. Somatostatin receptor subtype expression in human tumors. *Ann Oncol* 2001;12(Suppl 2):S31-36
- 4 Breeman WA, de Jong M, Kwekkeboom DJ, Valkema R, Bakker WH, Kooij PP, Visser TJ, Krenning EP. Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *Eur J Nucl Med* 2001;28:1421-1429
- 5 林静,王超,景燕,庞有成,杨红,乔进朋,陈勃,姚希贤.胃癌组织中内分泌细胞的表达及与细胞凋亡的关系.世界华人消化杂志 2000;8:1054-1055
- 6 de Herder WW, Lamberts SW. Somatostatin and somatostatin analogues: diagnostic and therapeutic uses. *Curr Opin Oncol* 2002;14:53-57
- 7 Culler MD, Taylor JE, Moreau JP. Somatostatin receptor subtypes: targeting functional and therapeutic specificity. *Ann Endocrinol (Paris)* 2002;63(2 Pt 3):2S5-12
- 8 Janecka A, Zubrzycka M, Janecki T. Somatostatin analogs. *J Pept Res* 2001;58:91-107
- 9 Hofslie E. The somatostatin receptor family-a window against new diagnosis and therapy of cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2002;122:487-491
- 10 江学良,傅丽娜. Ki67在大肠肿瘤研究中的应用. 复旦学报(医学科学版) 2001;28:372-374
- 11 Zolota V, Batistatou A, Tsamandas AC, Iliopoulos G, Scopa CD, Bonikos DS. Immunohistochemical expression of TGF-beta1, p21WAF1, p53, Ki67, and angiogenesis in gastric carcinomas: a clinicopathologic study. *Int J Gastrointest Cancer* 2002;32:83-89
- 12 Fricke E, Keller G, Becker I, Rosivatz E, Schott C, Plaschke S, Rudelius M, Hermannstadter C, Busch R, Hofler H, Becker KF, Luber B. Relationship between E-cadherin gene mutation and p53 gene mutation, p53 accumulation, Bcl-2 expression and Ki-67 staining in diffuse-type gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2003;104:60-65
- 13 Testino G, Gada D, De Iaco F, Cornaggia M. p53 and Ki-67 expression in epithelial gastric dysplasia and in gastric cancer. *Panminerva Med* 2002;44:369-371
- 14 Nagasako Y, Misawa K, Kohashi S, Hasegawa K, Okawa Y, Sano H, Takada A, Sato H. Evaluation of malignancy using Ki-67 labeling index for gastric stromal tumor. *Gastric Cancer* 2003;6:168-172
- 15 Kim KM, Oh YL, Ko JS, Choe YH, Seo JK. Histopathology and expression of Ki-67 and cyclooxygenase-2 in childhood *Helicobacter pylori* gastritis. *J Gastroenterol* 2004;39:231-237

瞬时转染CD44反义寡核苷酸抑制人胃癌MGC80-3细胞增生并诱导凋亡

荆雪宁, 张 玲, 王 芸, 毛海婷, 温培娥, 李登华, 崔树龄, 顾洪涛

荆雪宁, 张玲, 王芸, 毛海婷, 温培娥, 李登华, 崔树龄, 顾洪涛, 山东省医学科学院基础医学研究所免疫室 山东省济南市 250062
荆雪宁, 女, 1978-02-09 生, 山东省莱州市人, 汉族, 山东省医学科学院硕士研究生。
山东省医药卫生科研项目资助, No. 2003-139
项目负责人: 张玲, 250062, 山东省济南市经十路 89 号, 山东省医学科学院基础医学研究所免疫室, zhlnln@163.net
电话: 0531-2919933
收稿日期: 2004-07-12 接受日期: 2004-09-04

Inhibitory and apoptosis-inducing effects of CD44 antisense oligodeoxyribonucleotides on human gastric cancer cell line MGC80-3

Xue-Ning Jing, Ling Zhang, Yun Wang, Hai-Ting Mao, Pei-E Wen, Deng-Hua Li, Shu-Ling Cui, Hong-Tao Gu

Xue-Ning Jing, Ling Zhang, Yun Wang, Hai-Ting Mao, Pei-E Wen, Deng-Hua Li, Shu-Ling Cui, Hong-Tao Gu, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250062, Shandong Province, China
Supported by Shandong Medical Research Project, No. 2003-139
Correspondence to: Dr. Ling Zhang, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, 89 Jingshi Road, Jinan 250062, Shandong Province, China. zhlnln@163.net
Received: 2004-07-12 Accepted: 2004-09-04

Abstract

AIM: To study the role and mechanism of antisense oligodeoxyribonucleotides (ASODN) on proliferation and apoptosis of MGC80-3 cells.

METHODS: Flow cytometry was used to detect CD44, Fas expression and apoptosis of MGC80-3 cells. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was used to examine CD44 mRNA level; MTT assay was used to detect cell proliferation.

RESULTS: CD44 mRNA and CD44 protein expression in MGC80-3 cells was blocked and down-regulated after transfected with CD44ASODN (1.6 $\mu\text{mol/L}$). CD44ASODN inhibited the growth of MGC80-3 cells with depression ratios of 31.0%, 46.3% ($P < 0.01$), and 49.6% ($P < 0.01$) at 48 h, 72 h, and 96 h respectively in a time-dependant manner. With the existence of hyaluronic acid, CD44ASODN improved Fas expression in MGC80-3 cells from 6.7% to 16.8% ($P < 0.01$). At the same time, it enhanced the susceptibility of MGC80-3 cells to Fas mAb and the apoptotic rate of the cells increased from 0% to 26.5% ($P < 0.01$).

CONCLUSION: CD44ASODN can down-regulate the expression of CD44 mRNA and protein, inhibit MGC80-3 cell pro-

liferation and promote apoptosis induced by Fas mAb.

Jing XN, Zhang L, Wang Y, Mao HT, Wen PE, Li DH, Cui SL, Gu HT. Inhibitory and apoptosis-inducing effects of CD44 antisense oligodeoxyribonucleotides on human gastric cancer cell line MGC80-3. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2551-2554

摘要

目的: 研究 CD44 反义寡核苷酸(CD44ASODN)对人胃癌 MGC80-3 细胞的增生抑制和诱导凋亡的作用和机制。

方法: 设计并合成 CD44ASODN, 脂质体介导转入 MGC80-3 胃癌细胞, 采用流式细胞术(FACS)检测 CD44、Fas 的表达及细胞凋亡; RT-PCR 法检测 CD44mRNA 的表达; MTT 法检测细胞增生。

结果: CD44ASODN(1.6 $\mu\text{mol/L}$)明显地抑制 MGC80-3 细胞 CD44mRNA 和蛋白表达水平。CD44ASODN 作用 MGC80-3 细胞 48 h 后, 细胞的增生呈现明显的抑制作用, 其抑制率为 31.0%, 72, 96 h 的抑制率分别为 46.3%、49.6% ($P < 0.01$), 其增生抑制作用呈时间依赖效应。在 CD44 配体低分子质量透明质酸存在的环境中, CD44ASODN 能显著增高细胞表面 Fas 分子的表达, 表达率从 6.7% 提高为 16.8% ($P < 0.01$), 并显著地增加 MGC80-3 细胞对 Fas mAb 诱导凋亡的敏感性, 凋亡率从 0 增加到 26.5% ($P < 0.01$)。

结论: CD44 反义寡核苷酸通过抑制 MGC80-3 细胞 CD44mRNA 和蛋白表达, 抑制 MGC80-3 细胞的增生, 增高细胞表面 Fas 的表达及 MGC80-3 细胞对 Fas mAb 诱导凋亡的敏感性, 逆转胃癌细胞的免疫逃逸作用。

荆雪宁, 张玲, 王芸, 毛海婷, 温培娥, 李登华, 崔树龄, 顾洪涛. 瞬时转染 CD44 反义寡核苷酸抑制人胃癌 MGC80-3 细胞增生并诱导凋亡. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2551-2554

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2551.asp>

0 引言

黏附分子 CD44 以细胞特异性的方式表达于许多细胞表面, 在细胞黏附、信号传导及调节细胞迁移等过程中发挥重要作用。肿瘤细胞表面的 CD44 表达显著增高, 或表达 CD44 异构体的独特模式, 与肿瘤的发生、发展与远处侵袭转移关系密切, 是人类肿瘤转移和预后不良的标志。最新研究表明, CD44 与其细胞外基质配

体低分子质量透明质酸结合后,促进肿瘤细胞的增生,降低肿瘤细胞表面Fas的表达,通过Fas/FasL途径降低肿瘤细胞对CTL的敏感性,进而使肿瘤逃脱Fas介导的CTL杀伤^[1].我们通过设计合成CD44反义寡核苷酸(ASODN),封闭和抑制人低分化黏液腺胃癌MGC80-3细胞CD44表达,阐明CD44ASODN对MGC80-3细胞增生能力、Fas的表达及FasmAb诱导凋亡的影响,为CD44基因的肿瘤生物治疗,提供新的理论和实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 MGC80-3细胞株,由本室保存;RPMI1640、胰蛋白酶,为GIBCO产品;鼠抗人CD44(HCAM)、兔抗人Fas多克隆抗体,为Santa Cruz公司产品;FITC标记的羊抗兔IgG抗体、兔抗鼠IgG抗体购自华美生物公司;PI, HA, MTT为Sigma公司产品;鼠抗人FasmAb(AM01L)为Oncogene公司产品;脂质体(OligofectamineTM)为Invitrogen公司产品;TRIZOL Reagent为Invitrogen公司产品;oligo(dT)18,Rnasin为上海生工生物工程技术有限公司产品.逆转录试剂为Promega公司产品;PCR试剂,为宝生物工程有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 反义寡核苷酸合成、脂质体介导和转染 MGC80-3细胞^[2-3] CD44反义寡核苷酸序列与CD44 mRNA的5'端非编码区互补. CD44正反义寡核苷酸序列:反义(ASODN):5'-GCGCGGGCGAAAGG-AGCT-3',正义(SODN)5'-TCCGGACACCATGGACAAG-3',由上海生工生物工程技术有限公司合成,并进行了硫代化修饰.采用脂质体(OligofectamineTM, Invitrogen公司产品)介导法,形成CD44ASODN、SODN脂质体复合物(CD44A/SODN-OF).取对数生长期的MGC80-3细胞 5×10^5 /孔接种6孔板,待细胞密度增至30-50%时,加入不同浓度CD44A/SODN-OF转染,实验分组:(1)对照组,(2)ASODN处理组(0.8, 1.2, 1.6×10^{-3} mmol/L), (3)SODN处理对照组(0.8, 1.2, 1.6×10^{-3} mmol/L), 37℃, 50 ml/L CO₂培养4 h后弃转染液,加入新鲜培养液继续培养24 h, 48 h, 72 h.

1.2.2 流式细胞术检测 MGC80-3细胞CD44分子表达 收集处理72 h的对照组, ASODN组(1.6×10^{-3} mmol/L), SODN组(1.6×10^{-3} mmol/L)MGC80-3细胞($>10^6$),参照文献[4-5]进行检测.

1.2.3 RT-PCR法检测 MGC80-3细胞CD44mRNA表达^[6] 收集处理48 h的1.2.2述各组MGC80-3细胞($>10^6$),按TRIZOL Rengent说明,提取总RNA,定量后进行RT-PCR. DNA扩增产物以 β -actin基因作内参照,采用Gel Dos1000凝胶分析仪扫描分析并相对定量.

1.2.4 流式细胞术检测Fas分子的表达^[7-8]和细胞凋亡^[9-11] 实验分组中另设未处理对照(对照1)组,在上述对照(对照2)组、处理组细胞24 h转染后,加入CD44配体低分子质量透明质酸(简称HA)终浓度为0.1 g/L,刺

激24 h后收集细胞,检测Fas分子的表达.向转染和加入HA刺激24 h后的各组 and 对照1组中加入鼠抗人FasmAb终浓度为2 mg/L,继续作用24 h后收集细胞,检测细胞凋亡.

1.2.5 MTT法检测细胞增生^[12-13] 取对数生长期的MGC80-3细胞 5×10^7 /L接种于96孔板,37℃, 50 ml/L CO₂孵育过夜,各组细胞转染和加入HA后,继续培养24, 48, 72, 96 h.终止培养前4 h加入MTT(5 g/L),4 h后置酶标仪下测定.

统计学处理 采用SPSS10.0 for Windows统计软件进行 χ^2 检验、*t*检验,确定 $P < 0.05$ 为差异有显著性统计学意义.

2 结果

2.1 MGC80-3细胞CD44分子的表达 0.8, 1.2, 1.6×10^{-3} mmol/L CD44ASODN作用于MGC80-3细胞72 h后,细胞表面CD44蛋白的表达较对照组和SODN对照组显著下降($P = 0.0001 < 0.01$,表1), 1.6×10^{-3} mmol/L作用后,自48 h, 72 h后CD44蛋白表达显著下降($P = 0.0001 < 0.01$,表2),呈现出剂量和时间依赖效应.

表1 不同剂量CD44A/SODN-OF处理后MGC80-3 CD44分子阳性细胞的变化

Dose ($\times 10^{-3}$ mmol/L)	CD44 ⁺ cell (/10 000)	CD44expression (%)
Control	8 680	86.80
ASODN 0.8	5 345	53.45 ^b
SODN 0.8	9 449	94.49
ASODN 1.2	3 897	38.97 ^b
SODN 1.2	9 523	95.23
ASODN 1.6	3 439	34.39 ^b
SODN 1.6	8 205	82.05

^b $P < 0.01$ vs Control.

表2 CD44A/SODN-OF处理MGC80-3细胞后不同时间CD44分子阳性细胞的变化

Time (h)	CD44 ⁺ cell (/10 000)	CD44 expression (%)
Control 24	8 996	89.96
ASODN 24	9 551	95.51 ^b
SODN 24	9 876	98.76
Control 48	8 949	89.49
ASODN 48	4 419	44.19 ^b
SODN 48	9 824	98.24
Control 72	8 680	86.80
ASODN 72	3 837	38.37 ^b
SODN 72	9 529	95.29

^b $P < 0.01$ vs Control.

2.2 MGC80-3细胞CD44mRNA表达水平 在2, 3,

4泳道中清晰可见位于318 bp处的 β -actin和482 bp处的CD44片段(图1), 与对照组和SODN对照组相比, ASODN组的CD44基因表达下降, 相对定量值由1.09降至0.14, 表明CD44mRNA基因的表达受到抑制。

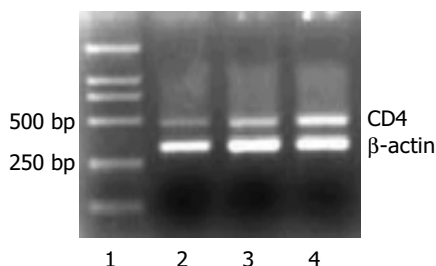


图1 CD44基因的RT-PCR扩增片段电泳结果。1: Marker; 2: ASODN; 3: SODN; 4: Control。

2.3 MGC80-3细胞Fas分子的表达 在HA的刺激下, MGC80-3细胞表面Fas分子表达下降, 由对照1组的21.7%降至对照2组的6.7%($P=0.0001<0.01$), CD44ASODN作用后, 与SODN组和对照2组相比, ASODN组Fas分子表达率显著增高, 由6.7%升至16.8%($P=0.0001<0.01$). 表明用CD44ASODN封闭CD44的表达后, 可显著地提高由HA诱导下降的Fas分子的表达(表3)。

表3 CD44A/SODN-OF处理48 h后MGC80-3细胞Fas阳性细胞的变化

Group	Dose($\times 10^{-3}$ mmol/L)	Fas ⁺ cell number/(10 000)	Fas expression(%)
Control 1		2 169	21.7
Control 2		669	6.7 ^b
ASODN	1.6	1 681	16.8 ^d
SODN	1.6	1 143	11.4

^b $P<0.01$ vs Control 1组; ^d $P<0.01$ vs Control 2组。

2.4 Fas单抗诱导MGC80-3细胞凋亡 对照组未检测到凋亡, 而48hASODN处理组细胞的凋亡率为26.6%, 显著高于SODN组(10.4%)和对照组(0)。

2.5 MGC80-3细胞增生活性 CD44ASODN处理48 h后的MGC80-3细胞, 在HA存在下, 与SODN组和对照组相比, 生长明显受到抑制, 48, 72和96 h的抑制率分别为31.0%、46.3%、49.6%($P=0.0001<0.01$), 并呈时间依赖效应(图2)。

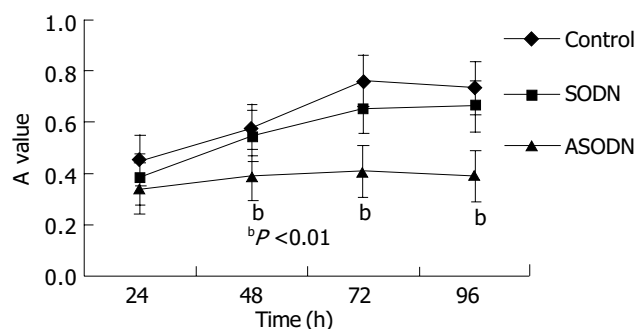


图2 CD44A/SODN-OF对MGC80-3细胞增生的影响。

3 讨论

肿瘤细胞表面常发生CD44表达显著增高, 或表达CD44异构体的独特模式, 与肿瘤的发生、发展与远处侵袭转移关系密切, 是人类肿瘤转移和不良预后的标志。最新研究表明, CD44可以通过多种途径参与肿瘤的免疫逃逸, 其中最重要的就是抑制肿瘤细胞凋亡和促进肿瘤细胞增生。Yasuda *et al*发现肺癌细胞过表达的CD44与其细胞外基质配体低分子质量透明质酸结合后, 降低肺癌细胞表面Fas的表达, 通过Fas/FasL途径降低肺癌细胞对CTL的敏感性, 进而使肺癌细胞逃脱CTL细胞通过FasL/Fas介导的凋亡^[1]。我们在实验中用CD44配体低分子质量HA刺激24 h后, 人低分化黏液腺胃癌MGC80-3细胞Fas分子表达率由21.7%降至6.7%, 采用体外Fas/FasL途径诱导凋亡的研究发现, 用FasmAb作用24 h后, MGC80-3细胞不出现凋亡, 同时细胞的增生活性高, 在体外观察到了胃癌细胞的免疫逃逸作用。为了抑制胃癌细胞增生和诱导凋亡, 我们设计合成CD44ASODN, 转入高表达CD44的人低分化黏液腺胃癌MGC80-3细胞中。结果表明, CD44ASODN封闭和抑制了MGC80-3细胞CD44 mRNA和蛋白表达, 且抑制作用呈时间和剂量依赖效应。用CD44ASODN处理MGC80-3细胞后, 加入HA作用, 细胞的Fas表达显著增高, 由下降的6.7%上升到16.8%。同时, 体外Fas/FasL途径诱导凋亡的研究发现, 加入鼠抗人FasmAb作用24 h后, CD44ASODN处理组细胞出现细胞凋亡, 其凋亡率为26.6%, 显著高于未处理对照组。可见, 用CD44ASODN抑制CD44基因的表达后, 可以显著地提高由HA诱导下降的Fas分子的表达, 并显著增加FasmAb诱导凋亡的敏感性。

大量研究表明, 在肿瘤组织中, 随着肿瘤的进展, CD44表达强度明显增加^[14-16]。因此, CD44的表达强度可以作为肿瘤预后不良的标志^[17-18]。在良性肿瘤中, CD44的表达呈现同质性, 而在恶性黑素瘤中, CD44主要集中于肿瘤的边缘, 促进肿瘤的增生和扩散^[19-20]。CD44分子的高表达促进肿瘤细胞的增生^[21], 增生能力的提高又促进CD44分子的表达^[22-23]。CD44与其配体HA结合之后, 引发细胞间 Ca^{2+} 流动, 促进细胞的增生^[24-26]。我们用 1.6×10^{-3} mmol/L CD44ASODN作用于MGC80-3细胞24 h后, 向培养液中加入HA继续作用24, 48, 72, 96 h, 发现CD44ASODN处理组较对照组具有明显的增生抑制作用, 且呈时间依赖性, 与CD44ASODN显著抑制CD44mRNA和蛋白的表达相一致, 因此表明, MGC80-3细胞的增生抑制可能是反义基因封闭CD44基因的表达所致。肿瘤细胞最基本的特征是无限制增生和凋亡抵抗。我们发现, 用CD44反义寡核苷酸阻断CD44的表达后, 一方面抑制MGC80-3细胞的增生能力, 另一方面增加MGC80-3细胞表面Fas的表达, 增加MGC80-3细胞对FasmAb诱导凋亡的敏感性, 提示CD44基因有可能成为肿瘤生物治疗的靶点。

4 参考文献

- 1 Yasuda M, Tanaka Y, Fujii K, Yasumoto K. CD44 stimulation down-regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis of lung cancer cells. *Int Immunol* 2001;13:1309-1319
- 2 Weil D, Garcon L, Harper M, Dumenil D, Dautry F, Kress M. Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. *Biotechniques* 2002;33:1244-1248
- 3 Beale G, Hollins AJ, Benboubetra M, Sohail M, Fox SP, Benter I, Akhtar S. Gene silencing nucleic acids designed by scanning arrays: anti-EGFR activity of siRNA, ribozyme and DNA enzymes targeting a single hybridization-accessible region using the same delivery system. *J Drug Target* 2003;11:449-456
- 4 Katoh S, Matsumoto N, Kawakita K, Tominaga A, Kincade PW, Matsukura S. A role for CD44 in an antigen-induced murine model of pulmonary eosinophilia. *J Clin Invest* 2003;111:1563-1570
- 5 Sheehy MR. A flow-cytometric method for quantification of neuropilofuscin and comparison with existing histological and biochemical approaches. *Arch Gerontol Geriatr* 2002;34:233-248
- 6 刘宇宏, 刘敬忠, 肖白, 王世鑫. CD₄₄ 在胃癌中异常表达的临床意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:89-90
- 7 Fujita Y, Kitagawa M, Nakamura S, Azuma K, Ishii G, Higashi M, Kishi H, Hiwasa T, Koda K, Nakajima N, Harigaya K. CD44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect. *FEBS Lett* 2002;528:101-108
- 8 王咏梅, 吴宗贵, 李莉, 张玲珍, 仲人前. 透明质酸酶和透明质酸对血管内皮细胞增生及 CD44 表达的影响. *第二军医大学学报* 2001;22:144-147
- 9 Li Y, Raffo AJ, Drew L, Mao Y, Tran A, Petrylak DP, Fine RL. Fas-mediated apoptosis is dependent on wild-type p53 status in human cancer cells expressing a temperature-sensitive p53 mutant alanine-143. *Cancer Res* 2003;63:1527-1533
- 10 Meli M, D'Alessandro N, Tolomeo M, Rausa L, Notarbartolo M, Dusonchet L. NF-kappaB inhibition restores sensitivity to Fas-mediated apoptosis in lymphoma cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:232-236
- 11 Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, Wiedner T, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC. CD95/Fas signaling in human melanoma cells: conditional expression of CD95L/FasL overcomes the intrinsic apoptosis resistance of malignant melanoma and inhibits growth and progression of human melanoma xenotransplants. *Oncogene* 2003;22:9131-9141
- 12 Brun P, Panfilo S, Daga Gordini D, Cortivo R, Abatangelo G. The effect of hyaluronan on CD44-mediated survival of normal and hydroxyl radical-damaged chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:208-216
- 13 Luan X, Diekwisch TG. CP27 affects viability, proliferation, attachment and gene expression in embryonic fibroblasts. *Cell Prolif* 2002;35:207-219
- 14 Terpe HJ, Storkel S, Zimmer U, Anquez V, Fischer C, Pantel K, Gunthert U. Expression of CD44 isoforms in renal cell tumors. Positive correlation to tumor differentiation. *Am J Pathol* 1996;148:453-463
- 15 Zagorianakou N, Stefanou D, Makrydimas G, Zagorianakou P, Briasoulis E, Karavasilis B, Agnantis NJ. CD44s expression, in benign, borderline and malignant tumors of ovarian surface epithelium. Correlation with p53, steroid receptor status, proliferative indices (PCNA, MIB1) and survival. *Anticancer Res* 2004;24:1665-1670
- 16 Lewy-Trenda I, Omulecka A, Janczukowicz J, Papierz W. CD44 expression in human meningiomas: an immunohistochemical analysis. *Pol J Pathol* 2004;55:33-37
- 17 Kawano T, Nakamura Y, Yanoma S, Kubota A, Furukawa M, Miyagi Y, Tsukuda M. Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer. *Auris Nasus Larynx* 2004;31:35-41
- 18 辛彦, 赵凤凯, 张素敏, 吴东瑛, 王艳萍, 徐蕾. CD44v6 基因编码蛋白表达与胃癌转移和预后的关系. *世界华人消化杂志* 1999;7:210-214
- 19 Serra M, Rabanal RM, Miquel L, Domenzain C, Bassols A. Differential expression of CD44 in canine melanocytic tumours. *J Comp Pathol* 2004;130:171-180
- 20 Bockhorn M, Roberge S, Sousa C, Jain RK, Munn LL. Differential gene expression in metastasizing cells shed from kidney tumors. *Cancer Res* 2004;64:2469-2473
- 21 Zhang JC, Wang ZR, Cheng YJ, Yang DZ, Shi JS, Liang AL, Liu NN, Wang XM. Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant exon 6 in primary tumors and corresponding lymph node metastases of colorectal carcinoma with Dukes' stage C or D. *World J Gastroenterol* 2003;9:1482-1486
- 22 Rioux-Leclercq N, Epstein JI, Bansard JY, Turlin B, Patard JJ, Manunta A, Chan T, Ramee MP, Lobel B, Moulinoux JP. Clinical significance of cell proliferation, microvessel density, and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:1209-1215
- 23 Zolota V, Tsamandas AC, Melachrinou M, Batistatou A, Scopa C. Expression of CD44 protein in renal cell carcinomas: association with p53 expression. *Urol Oncol* 2002;7:13-17
- 24 Singleton PA, Bourguignon LY. CD44 interaction with ankyrin and IP3 receptor in lipid rafts promotes hyaluronan-mediated Ca(2+) signaling leading to nitric oxide production and endothelial cell adhesion and proliferation. *Exp Cell Res* 2004;295:102-118
- 25 Termeer C, Averbek M, Hara H, Eibel H, Herrlich P, Sleeman J, Simon JC. Targeting dendritic cells with CD44 monoclonal antibodies selectively inhibits the proliferation of naive CD4+ T-helper cells by induction of FAS-independent T-cell apoptosis. *Immunology* 2003;109:32-40
- 26 Singleton PA, Bourguignon LY. CD44v10 interaction with Rho-kinase(ROK) activates inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor-mediated Ca2+ signaling during hyaluronan (HA)-induced endothelial cell migration. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002;53:293-316

EBV、*mdm2* 和 p53 基因异常在胃癌发生发展中的作用

孙迎娟, 王笑峰, 王 云, 孙坚萍, 黄葆华, 罗 兵

孙迎娟, 青岛大学医学院附属医院感染管理科 山东省青岛市 266003
王笑峰, 王云, 孙坚萍, 罗兵, 青岛大学医学院微生物学教研室
山东省青岛市 266021
黄葆华, 烟台毓璜顶医院病理科 山东省烟台市 264002
孙迎娟, 女, 1972-07-05 生, 山东省青岛市人, 汉族. 2003 年青岛大学医学院硕士研究生毕业, 主管检验师, 主要从事肿瘤病毒学研究.
项目负责人: 罗兵, 266021, 山东省青岛市登州路 38 号, 青岛大学医学院微生物学教研室. qdluobing@yahoo.com
电话: 0532-2991207
收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-11

Epstein-Barr virus and aberrant expression of *mdm2* and p53 in pathogenesis and development of gastric carcinoma

Ying-Juan Sun, Xiao-Feng Wang, Yun Wang, Jian-Ping Sun,
Bao-Hua Huang, Bing Luo

Ying-Juan Sun, Department of I Nosocomial Infection Management, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Xiao-Feng Wang, Yun Wang, Jian-Ping Sun, Bing Luo, Department of Microbiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Bao-Hua Huang, Department of Pathology, Yuhuangding Hospital, Yantai 264002, Shandong Province, China
Correspondence to: Dr. Bing Luo, Department of Microbiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China. qdluobing@yahoo.com
Received: 2004-09-18 Accepted: 2004-10-11

Abstract

AIM: To investigate the role of p53 and *mdm2* gene abnormality in oncogenesis and development of Epstein-Barr virus (EBV) -associated gastric carcinoma (EBVaGC) and to explore the relationship between EBV infection and p53 and *mdm2* protein expression.

METHODS: p53 gene mutation in exon 5-8 was detected by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP), and DNA sequencing. p53 and *mdm2* protein expression was tested by immunohistochemistry in EBVaGCs ($n = 13$), EBVnGCs (EBV negative gastric carcinomas, $n = 45$) with matched clinicopathological parameters and corresponding adjacent tissues of gastric carcinoma ($n = 58$).

RESULTS: The positive rates of p53 and *mdm2* protein in gastric carcinomas were significantly higher than those in corresponding adjacent normal tissues (86.2%, 29.3% vs 0%, 0% respectively; $P < 0.01$). There were no significant difference between the positive rates of p53 and *mdm2* protein in EBVnGCs and EBVaGCs. The overexpression rate of p53 protein was 15.4% (2/13) in EBVaGCs. This was in marked contrast to the rate of 57.8% (26/45) in EBVnGCs

($\chi^2 = 7.2593$, $P = 0.0085 < 0.01$). There was significant positive correlation between *mdm2* expression and p53 overexpression ($\chi^2 = 11.1839$, $P = 0.0008 < 0.01$, $r = 0.4391$). p53 gene mutation was found in only 2 cases of EBVnGCs and both occurred at exon 5. No p53 gene mutation was detected in 13 cases of EBVaGCs and 58 corresponding adjacent tissues.

CONCLUSION: Abnormal accumulation of p53 protein might not result from p53 gene mutation. *mdm2* protein may play an important role in the pathogenesis of gastric carcinoma through suppressing the function of wild type p53 protein. The infection of EBV relates to the abnormal expression of p53 protein, but not to the abnormal expression of *mdm2* protein and p53 gene mutation in gastric carcinoma

Sun YJ, Wang XF, Wang Y, Sun JP, Huang BH, Luo B. Epstein-Barr virus and aberrant expression of *mdm2* and p53 in pathogenesis and development of gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004; 12(11):2555-2559

摘要

目的: 探讨EBV相关胃癌(EBV associated gastric carcinoma, EBVaGC)组织中*mdm2*和p53基因异常与EBV感染的关系。

方法: 应用免疫组化技术检测 13 例EBVaGCs、45 例临床病理资料与之匹配的 EBV 阴性胃癌(EBV negative gastric carcinomas, EBVnGCs)以及 58 例相应癌旁组织中 p53 和 *mdm2* 蛋白的表达; PCR-SSCP 银染技术结合 DNA 测序检测 p53 基因 exon 5-8 突变。

结果: (1)胃癌组 p53 和 *mdm2* 蛋白阳性率分别为 86.2% (50/58)和 29.3%(17/58), 癌旁组织组 p53 和 *mdm2* 蛋白均为阴性, 胃癌组 p53 和 *mdm2* 蛋白阳性率均明显高于癌旁组织组, 两两间有极显著性差异($\chi^2 = 50.000$, $P = 0.000 < 0.01$; $\chi^2 = 15.059$, $P = 0.001 < 0.01$)。 (2) EBVnGC 组 p53 和 *mdm2* 蛋白阳性率与 EBVaGC 组 p53 和 *mdm2* 蛋白阳性率均无明显差异, 但 EBVaGC 组 p53 蛋白过表达率(15.4%)明显低于 EBVnGC 组(57.8%), 两组间有极显著性差异($\chi^2 = 7.2593$, $P = 0.0085 < 0.01$)。 (3)*mdm2* 蛋白阳性表达与 p53 蛋白过表达呈显著正相关($\chi^2 = 11.1839$, $P = 0.0008 < 0.01$, $r = 0.4391$)。 (4) 2 例 EBVnGCs 检测到 p53 基因突变, 突变均位于 exon 5, 13 例 EBVaGCs 和 58 例相应癌旁组织均未检测到 p53 基因突变; EBVaGC 组 p53 基因突变率与 EBVnGC 组相比无显著性差异($P = 0.5989$)。

结论: p53基因突变可能并非胃癌组织中p53蛋白异常累积的主要原因; mdm2蛋白可通过抑制野生型p53蛋白的功能而产生致癌作用; 胃癌组织中EBV感染与p53蛋白的异常表达有关, 而与mdm2蛋白的异常表达以及p53基因突变无显著相关性。

孙迎娟, 王笑峰, 王云, 孙坚萍, 黄葆华, 罗兵. EBV、mdm 2 和 p53 基因异常在胃癌发生发展中的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2555-2559
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2555.asp

0 引言

野生型 p53 基因是重要的抑癌基因, 其功能丧失或基因突变可促使恶性肿瘤形成. 小鼠双倍微体基因(mouse double minute, *mdm 2*)是近年发现的 p53 相关癌基因, 其在体内最重要的作用是抑制野生型 p53 的激活转录功能和抗肿瘤活性, *mdm 2* 的高表达可产生和 p53 基因突变相类似的作用, *mdm 2* 基因的扩增与过表达在肿瘤发生发展过程中具有普遍意义. 胃癌组织中p53蛋白异常表达的原因有多种, 如p53基因突变、*mdm 2*蛋白和/或病毒与野生型p53结合导致的p53蛋白失活等. 研究证实约 2/3 的软组织肉瘤中存在 p53 基因突变或 *mdm 2* 的过表达, 且均伴有 p53 蛋白过表达, p53 基因突变的肿瘤数目与 *mdm 2* 过表达的肿瘤数目大致相同, 但鲜有共存者. 提示 *mdm 2* 的过表达与 p53 基因突变在肿瘤发生阶段具有同等重要地位, 而且解释了相当一部分保持野生型p53基因肿瘤细胞的癌变机制^[1-8]. EBV感染与胃癌的发生有一定相关性, 其感染率存在地区差异, 普通胃腺癌的感染率约为 2-16%, 而较罕见的淋巴上皮瘤样胃癌EBV感染率达 80% 以上, 且EBV感染可见于各种病理类型的胃癌^[9-16]. 近年来EBVaGC中EBV与癌基因和抑癌基因的相互作用成为致癌机制研究的热点, 我们选择EBVaGCs和各种临床病理资料与之匹配的EBVnGCs作为研究对象, 应用免疫组化技术检测胃癌和相应癌旁组织中p53和*mdm 2*蛋白的表达; PCR-SSCP银染结合DNA序列分析检测p53基因 exon 5-8 突变情况, 以探讨 p53 和 *mdm 2* 基因异常与EBVaGC发生发展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 病理诊断与原位杂交证实EBVaGCs 13例, 临床病理资料与之匹配的EBVnGCs 45例, 平均年龄 57.9 ± 13.4(31-81岁), 男 48例, 女 10例. EBV阳性组和EBV阴性组病例在年龄、性别、肿瘤部位、组织学类型、分化程度、有无淋巴结转移以及临床分期等方面均无显著性差异($P>0.05$).

1.2 方法

1.2.1 p53 基因突变的检测 设计扩增 p53 基因 exon5-8 特异性引物^[17], 引物序列及PCR产物长度(表1). PCR反应体积25 μL, 反应体系为 10 × buffer 2.5 μL, MgCl₂

1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 上下游引物各 0.3 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.0 U, DNA 模板 2 μL. PCR 扩增参数为 94 °C 预变性 5 min; 然后 94 °C 30 s, 58 °C 复性 30 s (exon7 68 °C), 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min. 取 PCR 产物 2-3 μL 行 80 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳完毕后取下凝胶进行银染. 与正常对照相比, 可疑突变标本表现为单链 DNA 出现条带数目的增加、减少或位置的相对移位. 然后将可疑标本的 PCR 产物接入 pMD18-T-vector, 由上海中科开瑞生物技术有限公司进行 DNA 序列测定。

表1 PCR-SSCP 分析 p53 基因 exon5-8 突变用寡核苷酸引物

exon	primer(5' → 3')	product size(bp)
5	sense primer ttc aac tct gtc tcc ttc ct	248
	antisense primer cag ccc tgt cgt ctc tcc ag	
6	sense primer gcc ct gat tcc tca ctg at	181
	antisense primer tta acc cct cct ccc aga ga	
7	sense primer agg cgc act ggc ctc atc tt	177
	antisense primer tgt gca ggg tgg caa gtg gc	
8	sense primer ttc ctt act gcc tct tgc tt	231
	antisense primer agg cat aac tgc acc ctt gg	

1.2.2 *mdm 2* 和 p53 蛋白表达 采用免疫组化抗原热修复技术检测 p53 和 *mdm 2* 蛋白表达, 抗原修复液为枸橼酸缓冲液(pH6.0), 一抗分别为 1:100 稀释的鼠抗人 p53mAb Do-7 和鼠抗人 *mdm 2*mAb SMP14(均为 Santa Cruz Biotechnology, Inc 产品). 用 PBS 代替一抗作阴性对照; 分别用已知 p53 阳性的胃癌组织标本和 *mdm 2* 阳性的平滑肌肉瘤组织标本做阳性对照. p53mAb Do-7 免疫组化染色阳性信号呈棕黄色, 定位于细胞核中. 选取切片中阳性表达最强的 10 个视野, 根据阳性细胞数量的多少, 分成 ~# 级, 其中 -: 0; +: 1-25%; ++: 26-50%; +++: 51-75%; #: 76-100%^[18]. 根据阳性细胞核的着色深浅及均匀度, 分成 I - II 度, I 度表现为阳性细胞核不均匀的染色, 深浅不等; II 度表现为阳性细胞核强而均匀的着色. 将 p53 蛋白的过表达定为阳性分级 +++~#, 阳性度 II 度. *mdm 2* 阳性信号呈棕黄色, 以细胞质着色为主, 根据阳性细胞数量的多少, 分成 ~+++ 级, 其中 -: 0-5%; +: 6-20%; ++: 21-50%; +++: 51% 以上。

统计学处理 采用四格表 χ^2 检验和确切概率法对实验结果进行统计学分析, 用 SAS 6.12 统计软件处理。

2 结果

2.1 p53 基因突变 采用 PCR-SSCP 结合 DNA 序列分析测得阳性标本 2 例, 均为 EBVnGC, 突变率为 4.4%(2/45), 突变均发生在 exon 5, 而 13 例 EBVaGCs 和 58 例癌旁组织均未检测到 exon 5-8 的突变. 统计学分析表明 EBVaGC 组 p53 基因突变率与 EBVnGC 组相比无显著性差异($P=0.5989$). 2 例 PCR-SSCP 银染阳性标本 PCR 产

物经DNA序列测定证实,其突变类型和突变位置(表2)。图1为1例PCR-SSCP银染阳性标本DNA测序结果。

表2 EBVnGC exon5 的突变类型和突变位置

标本	EBV	exon	突变类型	突变位置(codon)
1	阴性	5	GC-AT	185
			AT-GC	169
2	阴性	5	G ^{del}	182

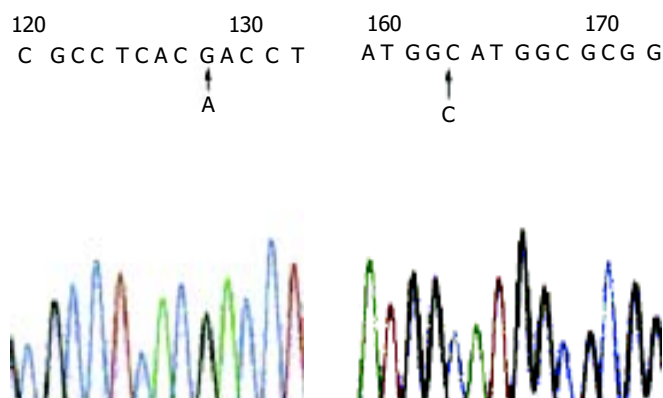


图1 胃癌组织中 p53 exon5 测序结果,在128处G代替A,而163后C缺失。

2.2 mdm 2 和 p53 蛋白的表达 胃癌组 mdm 2 和 p53 蛋白阳性检出率分别为29.3%(17/58)和86.2%(50/58), p53 蛋白过表达率为48.3%(28/58); 癌旁组织组 mdm 2 和 p53 蛋白染色均为阴性。统计学分析表明胃癌组 p53 蛋白的阳性检出率明显高于癌旁组织组,两组间有极显著性差异($P=0.000$, $\chi^2=50.000$); 胃癌组 mdm 2 蛋白的阳性检出率亦明显高于癌旁组织组,两组间有极显著性差异($P=0.0001$, $\chi^2=15.059$); 胃癌组织中存在 p53 和 mdm 2 蛋白的异常表达。在 58 例胃癌标本中,17 例 mdm 2 蛋白阳性表达的胃癌组织中 p53 蛋白均呈阳性表达,其中 p53 蛋白过表达的有 14 例,仅有 3 例 mdm 2 阳性的胃癌组织中无 p53 蛋白的过表达。28 例 p53 蛋白过表达的胃癌标本中有 14 例表现为 mdm 2 的过表达(占 50%),经计数资料相关性统计学分析表明胃癌组织中 mdm 2 蛋白表达与 p53 蛋白过表达呈显著正相关($P=0.0008$, $r=0.4391$, $\chi^2=11.1839$),提示 mdm 2 蛋白累积是引起 p53 蛋白过表达的一个重要因素。

2.3 EBVnGC 和 EBVaGC 组织中 p53 蛋白的表达 EBVnGC 组 p53 蛋白阳性检出率为 86.7%(39/45), p53 蛋白过表达率为 57.8%(26/45); EBVaGC 组 p53 蛋白阳性检出率为 84.6%(11/13), p53 蛋白过表达率为 15.4%(2/13)。统计分析结果显示,两组间 p53 蛋白阳性检出率无明显差异($P=0.7912$, $\chi^2=0.0716$),但 EBVaGC 组 p53 蛋白过表达率明显低于 EBVnGC 组,两组间有极显著性差异($P=0.0085$, $\chi^2=7.2593$),图2为免疫组化染色结果。

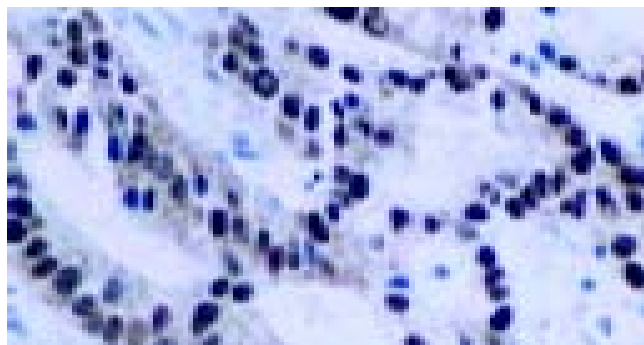


图2 EBVaGC 组织中 p53 蛋白的过表达(SABC × 400)

2.4 EBVnGC 和 EBVaGC 组织中 mdm 2 蛋白的表达 EBVnGC 组 mdm 2 蛋白阳性检出率为 31.1%(14/45), EBVaGC 组 mdm 2 蛋白阳性检出率为 23.1%(3/13)。与 EBVnGC 组相比 EBVaGC 组 mdm 2 蛋白阳性检出率有降低趋势,但统计分析结果显示,两组间 mdm 2 蛋白阳性检出率的差异无显著性($P=0.8300$, $\chi^2=0.0461$),图3为免疫组化染色结果。

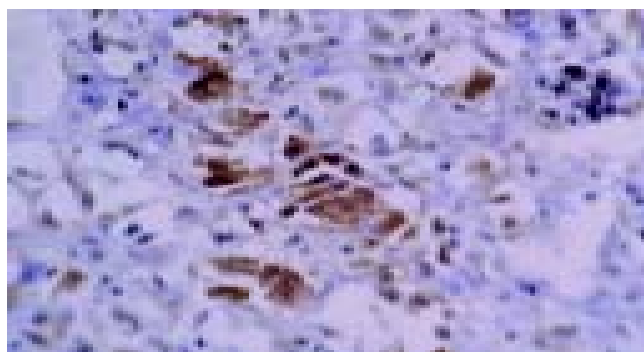


图3 EBVaGC 组织中 mdm2 蛋白的表达(SABC × 400)

3 讨论

p53 基因异常与胃黏膜细胞的癌变过程密切相关,胃癌组织中存在 p53 基因突变,导致其编码蛋白的功能异常从而参与胃癌的发生发展^[19-23]。本结果显示,胃癌组 p53 蛋白阳性检出率明显高于癌旁组织组,提示 p53 蛋白的异常表达与胃癌发生密切相关。EBVaGC 组和 EBVnGC 组 p53 蛋白阳性检出率无显著性差异,但 EBVaGC 组 p53 蛋白过表达率明显低于 EBVnGC 组,与 Ishii *et al*^[24]研究结果相似。表明 EBV 感染和 p53 基因异常与胃癌的发生有关,EBV 感染在胃癌发生过程中不能取代 p53 基因异常。p53 基因 exon5-8 是人类肿瘤中的突变热点区,本结果表明胃癌组织中 p53 基因 exon5-8 突变率较低,提示 p53 基因突变可能并非胃癌组织中 p53 蛋白异常累积的主要原因,胃癌组织中还存在其他原因所致的 p53 蛋白的异常表达。13 例 EBVaGCs 均未检测到 p53 基因突变热点的改变,胃癌组织中 EBV 感染与 p53 基因突变无显著相关性,推测 EBVaGC 癌细胞中 p53 蛋白的累积可能并非 p53 基因突变所致;且 EBVaGC p53 蛋白的过表达率明显低于 EBVnGC,表

明在EBVaGC发生发展中p53的作用不象在EBVnGC中那么重要。

*mdm2*基因是成瘤性很强的癌基因, *mdm2*基因第一内含子中存在p53依赖性启动子, 激活态的p53蛋白可与其内的两个串联成分结合激活 *mdm2* 转录与表达。同时 *mdm2* 蛋白分子中存在p53蛋白的结合部位, 当两蛋白形成复合物时, p53蛋白被灭活, 稳定性增高造成过表达。如此 *wt*p53和*mdm2*之间形成了一个负反馈调节环, 在维持 *wt*p53的正常生理功能方面具有重要作用^[25-27]。肿瘤组织中*mdm2*的异常主要表现为基因扩增和过表达, 从而导致野生型p53的抑癌活性丧失。有关*mdm2*基因与胃癌的关系目前存在两种观点, Blok *et al*^[28]的研究表明*mdm2*与胃癌的发生发展无关, 而Gunther *et al*^[29]的研究则认为*mdm2*基因扩增与胃癌扩散有关, 同时证实*mdm2*/p53途径与胃癌发生密切相关。国内孙利平 *et al*^[30]的研究证实*mdm2*基因扩增是胃癌发生的重要原因, 并且与肿瘤的分化程度密切相关。本研究免疫组化检测结果显示胃癌组织中存在*mdm2*蛋白的异常表达, 这也在一定程度上解释了胃癌组织中p53基因突变率低而p53蛋白过表达率高的原因。*mdm2*蛋白表达与p53蛋白过表达的相关性分析表明二者呈显著正相关, 证实*mdm2*至少部分通过拮抗野生型p53功能而在胃癌的发生发展中发挥作用, *mdm2*蛋白异常表达可能是导致胃癌组织中无p53基因结构改变而p53蛋白呈过表达的一个重要因素。而28例p53蛋白过表达的胃癌标本中仅有14例表现为*mdm2*的过表达(50%), 同时观察到58例胃癌组织中仅有2例发生p53基因突变, 提示胃癌组织中还存在其他原因导致的p53蛋白过表达。Luo *et al*^[31]的研究认为*mdm2*基因在NPC组织中的主要活化方式是蛋白的过表达而不是基因扩增, *mdm2*基因可能通过与p53相互作用在NPC的发生和转移过程中起重要作用, 而与EBV潜伏感染、NPC的T分期、NPC患者年龄、性别以及血清EBV-IgA滴度无关。EBVaGC组织中*mdm2*基因异常的研究尚未见报道, 本结果显示, 与EBVnGC组相比EBVaGC组*mdm2*蛋白阳性检出率有降低趋势, 但统计分析结果显示两组间*mdm2*蛋白阳性检出率无显著性差异, 提示胃癌组织中*mdm2*蛋白的表达与EBV感染无关。

总之, 我们研究结果表明EBV感染、p53和*mdm2*蛋白表达异常与胃癌发生有关; p53基因突变并非胃癌组织中p53蛋白异常累积的主要原因, *mdm2*蛋白可通过抑制野生型p53蛋白的功能而产生致癌作用, 同时还存在p53非依赖性途径的*mdm2*蛋白表达增高, *mdm2*蛋白表达增高有可能是造成胃癌组织中p53基因突变率低而p53蛋白过表达率高的原因之一; 胃癌组织中EBV感染与p53蛋白的异常表达有关, 而与*mdm2*蛋白的异常表达无显著相关性。

4 参考文献

- 1 Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. *mdm2* promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997;387:296-299
- 2 Liang H, Atkins H, Abdel-Fattah R, Jones SN, Lunec J. Genomic organization of the human *mdm2* oncogene and relationship to its alternatively spliced mRNAs. *Gene* 2004;338:217-223
- 3 Sengupta S, Wasylyk B. Physiological and pathological consequences of the interactions of the p53 tumor suppressor with the glucocorticoid, androgen and estrogen receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1024:54-71
- 4 Xie HL, Su Q, He XS, Liang XQ, Zhou JG, Song Y, Li YQ. Expression of p21(WAF1) and p53 and polymorphism of p21(WAF1) gene in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1125-1131
- 5 Seo YH, Joo YE, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Prognostic significance of p21 and p53 expression in gastric cancer. *Korean J Intern Med* 2003;18:98-103
- 6 Yu GZ, Zhu MH, Ni CR, Li FM, Zheng JM, Gong ZJ. Expression of proteins in p53 (p14ARF-mdm2-p53-p21WAF/CIP1) pathway and their significance in exocrine pancreatic carcinoma. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2004;33:130-134
- 7 Ito E, Saito K, Takizawa T, Koike M. Differential diagnosis of atypical epithelium of biopsied gastric mucosa using immunostaining of Ki-67, p53, hMLH1 and *mdm2* expression. *J Exp Clin Cancer Res* 2002;21:527-537
- 8 Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Growth pattern and expressions of cell cycle regulator proteins p53 and p21WAF1/CIP1 in early gastric carcinoma. *Cancer* 2001;92:1828-1835
- 9 Sugiura M, Imai S, Tokunaga M, Koizumi S, Uchizawa M, Okamoto K, Osato T. Transcriptional analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma: unique viral latency in the tumour cells. *Br J Cancer* 1996;74:625-631
- 10 zur Hausen A, Brink AA, Craanen ME, Middeldorp JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric carcinomas: expression of the transforming *BARF1* gene. *Cancer Res* 2000;60:2745-2748
- 11 Wu MS, Shun CT, Wu CC, Hsu TY, Lin MT, Chang MC, Wang HP, Lin JT. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas: relation to *H. pylori* infection and genetic alteration. *Gastroenterology* 2000;118:1031-1038
- 12 Lee HS, Chang MS, Yang HK, Lee BL, Kim WH. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma has a distinct protein expression profile in comparison with Epstein-barr virus-negative carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:1698-1705
- 13 Wang Y, Luo B, Zhao P, Huang BH. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinoma. *Ai Zheng* 2004;23:782-787
- 14 Luo B, Masanao M, Makoto F, Kazuoshi Y, Takeshi S. CD21-independent infection of a human signet ring cell gastric carcinoma cell line by Epstein-Barr virus. *Zhonghua Shiyao He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2004;18:59-61
- 15 Luo B, Murakami M, Fukuda M, Fujioka A, Yanagihara K, Sairenji T. Characterization of Epstein-Barr virus infection in a human signet ring cell gastric carcinoma cell line, HSC-39. *Microbes Infect* 2004;6:429-439
- 16 王笑峰, 罗兵, 王云, 阎丽平, 黄葆华, 赵鹏. EB病毒相关胃癌细胞凋亡与Bcl-2的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12:2028-2032
- 17 Chan WY, Chan EK, Chow JH. Epstein-Barr virus-associated gastric lymphomas are distinct from mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas: genetic abnormalities of p53 gene. *Diagn Mol Pathol* 2001;10:153-160
- 18 Leung SY, Chau KY, Yuen ST, Chu KM, Branicki FJ, Chung LP. p53 overexpression is different in Epstein-Barr virus-associated and Epstein-Barr virus-negative carcinoma. *Histopathology* 1998;33:311-317
- 19 Nishikura K, Watanabe H, Iwafuchi M, Fujiwara T, Kojima K, Ajioka Y. Carcinogenesis of gastric endocrine cell carcinoma: analysis of histopathology and p53 gene alteration. *Gastric Cancer* 2003;6:203-209

- 20 Gonda G, Bajtai A, Nagy P, Szanto I, Kiss J. Quantitative analysis of p53 expression and cell proliferation in gastric carcinomas. An immunohistochemical study. *Hepatogastroenterology* 2004;51:273-276
- 21 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406
- 22 Morgan C, Jenkins GJ, Ashton T, Griffiths AP, Baxter JN, Parry EM, Parry JM. Detection of p53 mutations in precancerous gastric tissue. *Br J Cancer* 2003;89:1314-1319
- 23 Tian SF, Xiong YY, Yu SP, Lan J. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and expressions of tumor suppressor genes in gastric carcinoma and related lesions. *Ai Zheng* 2002;21:970-973
- 24 Ishii H, Gobe G, Kawakubo Y, Sato Y, Ebihara Y. Interrelationship between Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas and the expression of apoptosis-associated proteins. *Histopathology* 2001;38:111-119
- 25 Zhang R, Mayhood T, Lipari P, Wang Y, Durkin J, Syto R, Gesell J, McNemar C, Windsor W. Fluorescence polarization assay and inhibitor design for mdm2/p53 interaction. *Anal Biochem* 2004;331:138-146
- 26 Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K. p53 gene status and expression of p53, mdm2 and p14 proteins in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2004;33:292-299
- 27 Dai MS, Zeng SX, Jin Y, Sun XX, David L, Lu H. Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting mdm2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* 2004;24:7654-7668
- 28 Blok P, Craanen ME, Dekker W, Offerhaus GJ, Tytgat GN. No evidence for functional inactivation of wild-type p53 protein by mdm2 gene overexpression in gastric carcinogenesis. *J Pathol* 1998;186:36-40
- 29 Gunther T, Schneider-Stock R, Hackel C, Kasper HU, Pross M, Hackelsberger A, Lippert H, Roessner A. mdm2 gene amplification in gastric cancer correlation with expression of mdm2 protein and p53 alterations. *Mod Pathol* 2000;13:621-626
- 30 孙利平, 李岩, 张宁, 姜乃佳, 付伟, 薛一雪. MDM2 基因扩增和蛋白表达与胃癌相关性的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1800-1801
- 31 Luo JL, Xiao JY, Tian YQ, Zhao SP, Liu JW, Tao ZD. mdm2 gene expression in nasopharyngeal carcinoma and its relationship with p53 protein expression and EB virus latent infection. *Linchuang Erbi Yanhouke Zazhi* 2000;14:507-509

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物, 可作为理工科研究生的教学用书或自学教材, 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍, 介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求. 从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity), 分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写, 举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 结合实例举证, 从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达, 较为详尽地总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。

本书论述缜密、案例丰富. 为方便读者进一步追溯和研读相关资料, 书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次)。

编著: 任胜利, 理学博士, 《自然科学进展》责任编辑, 1998 年以来先后在 Science, Nature, Scientometrics, Learned Publishing, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 余篇. 出版: 科学出版社. 定价: 28 元 + 2 元(邮费). 邮购地址: 100085, 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室, 北京市海淀区双清路 83 号. 联系人: 刘俐, 程宇. 联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921. 开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开户名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社, 帐号: 0200010009200062483. (国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)

胃癌组织 PTEN、cyclinE 表达与幽门螺旋杆菌感染的关系

周庆华, 刘丽娜, 吕 申, 王 梅, 刘春英

周庆华, 刘春英, 大连铁路医院消化内科 辽宁省大连市 116001
刘丽娜, 王梅, 大连医科大学附属一院消化内科 辽宁省大连市 116003
吕申, 大连医科大学附属二院中心实验室 辽宁省大连市 116021
项目负责人: 周庆华, 116001, 辽宁省大连市, 大连铁路医院消化内科.
qinghuazhou@msn.com
电话: 0411-82831087
收稿日期: 2004-06-30 接受日期: 2004-08-21

Relationship between expression of PTEN and cyclinE and *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer

Qing-Hua Zhou, Li-Na Liu, Shen Lv, Mei Wang, Chun-Ying Liu

Qing-Hua Zhou, Chun-Ying Liu, Section of Digestive Diseases, Department of Internal Medicine, Railway Hospital, Dalian 116001, Liaoning Province, China

Li-Na Liu, Mei Wang, Section of Digestive Diseases, Department Internal Medicine, First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116003, Liaoning Province, China

Shen Lv, Central Laboratory, Second Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116021, Liaoning Province, China

Correspondence to: Qing-Hua Zhou, Section of Digestive Diseases, Department of Internal Medicine, Railway Hospital, Dalian 116001, Liaoning Province, China. qinghuazhou@msn.com

Received: 2004-06-30 Accepted: 2004-08-21

Abstract

AIM: To investigate the relationship between *H pylori* infection and PTEN, cyclinE expression in gastric cancer and adjacent mucosal tissues, and to study the possible mechanism of *H pylori* in gastric carcinogenesis.

METHODS: Both rapid urease and pathological test were used to examine *H pylori* in 59 cases of specimen. The expression of PTEN and cyclinE in gastric cancer and adjacent mucosal tissues was detected by immunohistochemical technique (SP method).

RESULTS: PTEN expression in gastric cancer tissues was significantly lower than that in the cancer adjacent tissues (50.85% vs 96.61%, $P < 0.05$); however, CyclinE expression in gastric cancer tissues was significantly higher than that in cancer adjacent tissues. The level of PTEN expression in well-differentiated adenocarcinoma was significantly higher than that in poorly-differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma (68.4% vs 33.3%, $P < 0.05$; 68.4% vs 37.5%, $P < 0.05$ respectively); however, the level of CyclinE expression in well-differentiated adenocarcinoma was significantly lower than that in poorly-differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma (31.5% vs 68.8%, $P < 0.05$; 31.5% vs 66.7%, $P < 0.05$); PTEN expression in *H Pylori* positive group was lower than that in *H pylori* negative group (51.9% vs 59.4%, $P > 0.05$); CyclinE ex-

pression had no significant difference between *H pylori* positive and negative gastric cancer tissues.

CONCLUSION: Pathogenesis of gastric cancer relates to loss of suppression gene PTEN and over-expression of oncogene cyclinE, and suppression gene PTEN probably plays a role in development of gastric cancer induced by *H pylori* infection.

Zhou QH, Liu LN, Lv S, Wang M, Liu CY. Relationship between expression of PTEN and cyclinE and *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2560-2563

摘要

目的: 探讨胃癌及癌旁组织中 *H pylori* 感染和 PTEN、cyclinE 表达, 他们之间的相关性以及胃癌发生的可能机制。

方法: 每例标本采用快速尿素酶试验, 组织病理学检测两种方法检查 *H pylori*, 采用免疫组化法检测胃癌组织及癌旁组织 59 例中 PTEN 及 cyclinE 的表达。

结果: 胃癌组织 PTEN 在阳性率明显低于癌旁组织, 二者之间有显著差异(50.85% vs 96.61% $P < 0.05$); 胃癌组织 cyclinE 阳性率高于癌旁组织, 二者之间有显著差异(55.93% vs 40.7% $P > 0.05$); PTEN 在高中分化腺癌中的表达率明显高于低分化腺癌和黏液癌, 有显著差异(68.4% vs 33.3% $P < 0.05$, 68.4% vs 37.5%, $P < 0.05$); 胃黏液癌及低分化腺癌 CyclinE 阳性表达明显高于高中分化腺癌, 有显著差异(68.8% vs 31.5% $P < 0.05$, 66.7% vs 31.5%, $P < 0.05$); *H pylori* 阳性的 PTEN 阳性表达率明显低于 *H pylori* 阴性, 二者之间有显著差异(24.2% vs 69.2% $P < 0.05$); cyclinE 表达阳性率在 *H pylori* 阳性和阴性胃癌中, 二者之间无显著差异(51.9% vs 59.4% $P > 0.05$)。

结论: 胃癌的发生与抑癌基因 PTEN 的下调和癌基因 cyclinE 的过度表达有关, *H pylori* 感染的致癌机制中可能有抑癌基因 PTEN 参与。

周庆华, 刘丽娜, 吕申, 王梅, 刘春英. 胃癌组织 PTEN、cyclinE 表达与幽门螺旋杆菌感染的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2560-2563

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2560.asp>

0 引言

PTEN/MMAC1/TEP1 即细胞骨架蛋白同源的磷酸酶的

编码蛋白(phosphatase homologue PTEN)^[1],是目前发现的第一个具有磷酸酯酶活性的抑癌基因,既有抑制生长作用,又有促进细胞凋亡作用,参与细胞周期以及抑制细胞黏附及肿瘤转移^[2].而癌基因cyclinE是细胞进入S期的关键性调节基因,加速G1-S期转化,在G1晚期起作用^[3],与人类肿瘤有关^[4].*H pylori*与胃癌发生有密切关系,但引起胃癌的确切机制目前尚不明确,有学者认为与肿瘤相关基因的异常表达有关^[5-6].

1 材料和方法

1.1 材料 2003-01/2003-10大连医科大学附属一院经胃镜检查诊断为胃癌,并于镜下活检以及外科行胃大部切除的标本59例,均经病理确诊并分型,其中高分化腺癌为19例,低分化腺癌24例,黏液腺癌16例.在胃镜下取得的癌旁组织距癌组织至少5cm,在胃大部切除术后取得的癌旁组织为与癌组织最远处,也经病理确诊并分型,其中肠化生26例,胃炎34例,所有患者受检前均未经放化疗等治疗.患者禁食10h后于胃镜直视下取标本,胃癌组织3块,并经快速尿素酶试验检查,以确定有无*H pylori*感染,之后再用于组织学检查.男43例,女16例,平均年龄为62.1±25.6岁,所有标本经40g/L中性甲醛固定,石蜡包埋,连续切片厚3-5μm.常规HE染色,根据组织结构和细胞形态诊断肠化生组织、胃炎组织、高中分化腺癌、低分化腺癌、胃黏液癌.

1.2 方法 *H pylori*检测:采用尿素酶试验法及组织学诊断,后者用改良Giemsa染色法,二种方法均阳性定为*H pylori*阳性;二者均阴性定为*H pylori*阴性.免疫组化染色:PTEN、cyclinE抗体分别设阴性和阳性对照,阳性对照为已知表达阳性的组织,阴性对照以PBS代替一抗.免疫组化所用鼠抗人mAbPTEN、cyclinE及SP、DAB试剂均购于北京中山生物技术有限公司.操作步骤按说明进行.免疫组化染色结果的判定:检测PTEN、cyclinE阳性信号在细胞核内呈现棕褐色颗粒,以阳性细胞的百分比判断结果.每例切片选5个区域40倍高倍视野,每个区域记数200个细胞,按阳性细胞占同类计数细胞的百分比将免疫组化结果分为阴性,即百分比<5%;阳性为百分比>5%.实验结果拍摄成像.

统计学处理 采用SPSS软件进行统计分析,采用 χ^2 检验对免疫组化结果进行分析处理,以 $P<0.05$ (双侧)为有统计学意义.

2 结果

2.1 胃癌组织 PTEN、和 cyclinE 的表达在59例胃癌组织中有30例PTEN阳性,阳性率50.9%.59例癌旁组织中有57例PTEN阳性,阳性率为96.6%,二者之间有显著性差异($\chi^2=31.89$, $P<0.05$ 表1).59例胃癌组织中有33例cyclinE阳性,阳性率为55.9%,在癌旁组织中有24例阳性,阳性率为40.7%,二者之间无显

著性差($\chi^2=2.74$, $P>0.05$).

表1 胃癌及癌旁组织中 PTEN, cyclinE 的表达($n=59$)

组织	PTEN			CyclinE		
	+	-	阳性率(%)	+	-	阳性率(%)
胃癌	30	29	50.9	33	26	55.9
癌旁	57	2	96.6	24	35	40.7

2.2 19例高中分化腺癌中,13例PTEN阳性(图1),阳性率为68.4%,24例低分化腺癌中8例PTEN阳性,阳性率为33.3%,在16例黏液癌中有6例阳性,阳性率为37.5%,高中分化腺癌中的表达率明显高于低分化腺癌和黏液癌,与二者比较有显著性差异(分别为 $\chi^2=5.58$ $P<0.05$; $\chi^2=6.3$, $P<0.05$).黏液癌与低分化腺之间无显著性差异($\chi^2=0.11$, $P>0.05$).PTEN在癌旁组织中,25例肠化生组织中有23例阳性,阳性率为92.0%,而在34例胃炎组织全部阳性,阳性率为100%,肠化生组织的阳性表达率虽低于胃炎组织,但二者之间无显著性差异($\chi^2=0.16$, $P>0.05$).CyclinE在胃黏液癌、胃低分化腺癌、胃高中分化腺癌中阳性表达分别为11、16、6例;cyclinE阳性表达率分别为68.8%、66.7%及31.6%,胃黏液癌阳性表达明显高于胃高中分化腺癌,有显著性差异($\chi^2=4.11$, $P<0.05$),胃低分化腺癌阳性表达也明显高于胃高中分化腺癌,有显著性差异($\chi^2=5.23$, $P<0.05$);胃黏液癌阳性表达略高于胃低分化腺癌,二者之间无显著性差异($\chi^2=0.045$, $P>0.05$).癌旁组织中cyclinE在25例肠化生组织中的14例阳性,阳性率56.0%,34例胃炎组织中, cyclinE有9例阳性,阳性表达率为26.5%,肠化生组织中cyclinE的阳性表达率明显高于胃炎组织,二者之间有显著性差异($\chi^2=9.47$, $P<0.05$,表2).

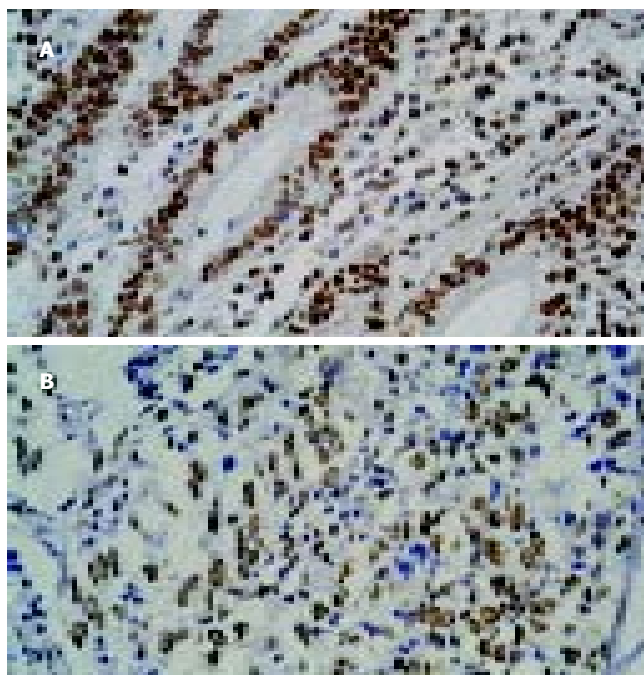


图1 PTEN, cyclinE 在高分化腺癌、黏液腺癌中的表达. A: 高分化腺癌 PTEN(+), SP X 400; B: 黏液腺癌 cyclinE(+), SP X 400.

表2 胃癌病理组织类型与 PTEN、cyclinE 表达

病理	n	PTEN			CyclinE		
		+	-	阳性率(%)	+	-	阳性率(%)
肠化生	25	23	2	92.0	14	11	56.0
胃炎组织	34	34	0	100	9	25	26.5
高中分化腺癌	19	14	5	73.7	6	13	31.6
低分化腺癌	24	9	15	37.5	16	8	66.7
黏液癌	16	5	11	31.3	11	5	68.8
总计	118	30	88		56	62	

2.3 胃癌与 *H pylori* PTEN、cyclinE 的关系 在 *H pylori* 阳性和 *H pylori* 阴性胃癌中, PTEN 表达阳性率分别为 36.3% 和 76.5%(表3), *H pylori* 阳性者明显低于 *H pylori* 阴性, 二者之间有显著性差异($\chi^2 = 11.94$, $P < 0.05$). 在 *H pylori* 阳性和 *H pylori* 阴性胃癌中, cyclinE 表达阳性率分别为 51.9% 及 59.4%, 二者之间无显著差异($\chi^2 = 0.34$, $P > 0.05$).

表3 胃癌中 *H pylori* 感染和 PTEN、cyclinE 表达的关系

<i>H pylori</i>	PTEN			CyclinE		
	+	-	阳性率(%)	+	-	阳性率(%)
+	8	25	24.2	14	13	51.9
-	18	8	69.2	19	13	59.4
	26	33		33	26	

3 讨论

文献报道, PTEN 作为一种抑癌基因, 参与细胞凋亡调控^[7-8]. 近年研究发现, 其表达与一些恶性肿瘤发生发展、生物学行为和预后密切的关系^[9-10], 但对 PTEN 在胃癌中的表达却有不一致的报道^[11-12]. 本结果显示, PTEN 在癌组织中的表达明显低于癌旁组织, 提示在胃癌组织中 PTEN 表达下调, 在由胃炎组织或肠化生组织向癌组织进化演变中抑癌基因 PTEN 的减少会导致对肿瘤的抑制作用的减弱. 本资料还显示, PTEN 在高中分化腺癌阳性表达明显低于低分化腺癌及黏液腺癌, 而在低分化腺癌和黏液癌中的表达无明显差别, 提示 PTEN 表达与胃癌的临床病理特征及生物学行为有密切关系. PTEN 阳性表达越低其肿瘤的恶性程度越高, 愈后越差. 此结果与有关报道一致^[13-15]. CyclinE 与细胞周期素依赖激酶 2(CDK2) 结合形成复合物, 该复合物的浓度是细胞通过 G1-S 调解点的最关键因素^[16-18]. 异常细胞内 cyclinE 无顺序、无计划地过度表达, 在整个细胞周期中含量过高, 可持续地激活 CDK2 区磷酸化底物, 促进细胞由 G1 期进入 S 期, 驱使细胞超越某些控制机制异常增生^[19-20]. CyclinE 过度表达与细胞的肿瘤明显相关^[21-22]. 我们发现在高分化腺癌, 低分化腺癌及黏液腺癌中 cyclinE 的表达阳性率分别为 31.6%、66.7% 及 68.8%, 说明随着肿瘤恶性程度升高、分化程度降

低, cyclinE 的表达率增高, 提示 cyclinE 与细胞分化和肿瘤的恶性程度有关. 结果还发现 cyclinE 的表达在癌组织高于癌旁组织, 提示癌基因 cyclinE 参与胃癌的发生. 在癌旁组织中, 肠化生组织的表达高于胃炎组织. 肠化生组织可视为一个癌前病变, 在肠化生组织中 cyclinE 增高提示在胃癌发生早期有 cyclinE 的参与. 关于肠化生组织的 cyclinE 阳性表达高于高分化腺癌, 考虑原因如下: (1) 低分化腺癌及黏液腺癌的癌旁组织中, 有肠化生的为 22 例, 占有肠化生病例(25 例)的 88% 为大多数; (2) CyclinE 的表达率与癌的恶性程度相关, 且多发生在癌的早期, 故在低分化腺癌及黏液腺癌癌旁组织中, cyclinE 的表达率较高为 60.4%, 以上两个原因使总的肠化生组织中的阳性表达率较高为 56.0%, 而高分化腺癌恶性程度低, 其癌旁组织中肠化生的例数少, 为 3 例, 仅占 12%, 对总的肠化生中的 cyclinE 的表达率影响小, 故肠化生的 cyclinE 的阳性表达率高于高分化腺癌的 31.6%.

幽门螺杆菌(*H pylori*)是重要的致癌因素已受到越来越多的资料的证实^[23-24]. 当幽门螺杆菌感染后, 宿主细胞对 *H pylori* 产生的反应分为速发性和迟发性两类, 迟发性反应多数涉及到基因表达的变化^[25]. 近期一些研究者应用 cDNA array 分析了 *H pylori* 诱导的胃上皮细胞基因表达谱的变化. Chiou *et al* 报道, 在 *H pylori* 的刺激下, 胃癌细胞株有 21 个基因上调和 17 个基因下调^[26]. 所以对基因表达变化的进一步研究, 将有助于了解宿主细胞的抵抗策略和适应性变化的根本机制, 从而为干预有关环节, 减轻宿主细胞对 *H pylori* 的易感性提供新的思路^[27-28]. 我们发现 cyclinE 在 *H pylori* 阳性的组织中与 *H pylori* 阴性组织中分别为 51.9% 及 59.4% 二者无显著性差异, 提示 cyclinE 在胃癌中的表达变化可能与 *H pylori* 感染无明显相关性. PTEN 在 *H pylori* 阳性患者中为 36.3%, 低于在阴性患者中的 76.9%, 有显著性差异, 提示 *H pylori* 感染的胃癌患者中可能有 PTEN 的表达下调, 二者之间可能有一定的相关性. 关于 cyclinE、PTEN 与 *H pylori* 感染的关系, 文献报道甚少, 其他抑癌基因和癌基因与 *H pylori* 在胃癌的关系研究亦鲜有报道. 因此, *H pylori* 感染导致胃癌的途径有很多种^[29-30], 能否通过对癌基因及抑癌基因的影响而致癌, 还需进一步研究.

4 参考文献

- Lee C, Kim JS, Waldman T. PTEN gene targeting reveals a radiation-induced size checkpoint in human cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:6906-6914
- 况立革, 杨琳, 王艳萍, 李锦毅, 吴东瑛, 张素民, 辛彦. PTEN 基因编码产物与胃癌发生发展相关性的研究. *肿瘤防治杂志* 2002; 9:472-475
- 刘晓波, 姜彦多, 王继红, 庄宝珠. CyclinE 蛋白异常表达在胃癌的意义. *中国肿瘤临床* 2000;27:508-510
- Yu J, Miehlik S, Ebert MP, Szokodi D, Wehvnigh B, Malfertheiner P, Ehninger G, Bayerdoerffer E. Expression of cyclin genes in human gastric cancer and in first degree relatives. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:710-715

- 5 Hamajima N, Goto Y, Nishio K, Tanaka D, Kawai S, Sakakibara H, Kondo T. *Helicobacter pylori* eradication as a preventive tool against gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004;5:246-252
- 6 Selbach M, Moese S, Backert S, Jungblut PR, Meyer TF. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics* 2004;4:2961-2968
- 7 Maurice-Duelli A, Ndoeye A, Bouali S, Leroux A, Merlin JL. Enhanced cell growth inhibition following PTEN nonviral gene transfer using polyethylenimine and photochemical internalization in endometrial cancer cells. *Technol Cancer Res Treat* 2004;3:459-466
- 8 Ohigashi T, Mizuno R, Nakashima J, Marumo K, Murai M. Inhibition of Wnt signaling downregulates Akt activity and induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells. *Prostate* 2004[Epub ahead of print]
- 9 郭双平, 瞿宇强, 王文亮, 马福成. 一种新的抑癌基因 PTEN 在肾细胞癌中的表达及生物学意义. *癌症* 2002;21:582-587
- 10 Khan S, Kumagai T, Vora J, Bose N, Sehgal I, Koeffler PH, Bose S. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer* 2004;112:407
- 11 Zhou YJ, Xiong YX, Wu XT, Shi D, Fan W, Zhou T, Li YC, Huang X. Inactivation of PTEN is associated with increased angiogenesis and VEGF overexpression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:3225-3229
- 12 Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:35-39
- 13 Zheng HC, Li YL, Sun JM, Yang XF, Li XH, Jiang WG, Zhang YC, Xin Y. Growth, invasion, metastasis, differentiation, angiogenesis and apoptosis of gastric cancer regulated by expression of PTEN encoding products. *World J Gastroenterol* 2003;9:1662-1666
- 14 Sun H, Zheng H, Yang X, Wu D, Zhang S, Kuang L, Xin Y. Expression of PTEN and Caspase-3 and their clinicopathological significance in primary gastric malignant lymphoma. *Chin Med Sci J* 2004;19:19-24
- 15 Tsugawa K, Jones MK, Akahoshi T, Moon WS, Maehara Y, Hashizume M, Sarfeh II, Tarnawski AS. Abnormal PTEN expression in portal hypertensive gastric mucosa: a key to impaired PI 3-kinase/Akt activation and delayed injury healing? *FASEB J* 2003;17:2316-2318
- 16 Shcherbata HR, Althausen C, Findley SD, Ruohola-Baker H. The mitotic-to-endocycle switch in *Drosophila* follicle cells is executed by Notch-dependent regulation of G1/S, G2/M and M/G1 cell-cycle transitions. *Development* 2004;131:3169-3181
- 17 杨晓东, 王杉, 梁斌, 姜可伟, 于永祥. 细胞周期素 E 及细胞周期素依赖性激酶 2 在胃癌组织中的表达及意义. *中华普通外科杂志* 2001;16:301-303
- 18 Cam WR, Masaki T, Shiratori TY, Kato N, Okamoto M, Yamaji Y, Igarashi K, Sano T, Omata M. Activation of cyclin E-dependent kinase activity in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2001;46:2187-2198
- 19 Bardon S, Foussard V, Fournel S, Loubat A. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Lett* 2002;181:187-194
- 20 Miehke S, Yu J, Ebert M, Szokodi D, Vieth M, Kuhlisch E, Buchcik R, Schimmin W, Wehrmann U, Malfertheiner P, Ehninger G, Bayerdorffer E, Stolte M. Expression of G1 phase cyclins in human gastric cancer and gastric mucosa of first-degree relatives. *Dig Dis Sci* 2002;47:1248-1256
- 21 李远晃, 徐志林. 胃癌组织 cyclinE 和 p53 蛋白表达的研究. *中国现代医学杂志* 2002;12:24-25
- 22 吕刚, 韩壮, 王敏, 孙传海, 张学. p27KIP1 和 cyclinE 在骨肉瘤中表达的意义. *中国肿瘤临床* 2002;29:3
- 23 Lin HJ, Xue J, Bai Y, Wang JD, Zhang YL, Zhou DY. Pathogenicity and immune prophylaxis of cag pathogenicity island gene knock-out homogenic mutants. *World J Gastroenterol* 2004;10:3289-3291
- 24 Sugiyama T, Asaka M. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Med Electron Microsc* 2004;37:149-157
- 25 Torres MM, Acosta CP, Sicard DM, Groot de Restrepo H. Genetic susceptibility and risk of gastric cancer in a human population of Cauca, Colombia. *Biomedica* 2004;24:153-162
- 26 刘文忠. 幽门螺旋杆菌研究进展. 第 1 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2001:41-42
- 27 Konturek PC, Kania J, Kukharsky V, Raithel M, Ocker M, Rembiasz K, Hahn EG, Konturek SJ. Implication of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and proinflammatory cytokines in gastric carcinogenesis: link to *Helicobacter pylori* infection. *J Pharmacol Sci* 2004[Epub ahead of print]
- 28 Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Sheu BS, Muta T, Inoue H, Chen CC. Induction of cyclooxygenase-2 Overexpression in Human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src dependent NF- κ B activation. *Mol Pharmacol* 2004[Epub ahead of print]
- 29 张艳, 范学工, 田雪飞, 黄燕. 幽门螺杆菌对肝细胞系 HepG2 cyclinD1, PCNA mRNA 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:93-96
- 30 Nagata J, Kijima H, Takagi A, Ito M, Goto K, Yamazaki H, Nakamura M, Mine T, Ueyama Y. *Helicobacter pylori* induces chronic active gastritis in p53-knockout mice. *Int J Mol Med* 2004;13:773-777
- 31 孟华, 刘丽娜, 吕申. 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达. *世界华人消化杂志* 2004;12:494-496

扶正抑瘤饮及其配伍不同化疗药物对人胃癌细胞增生的抑制作用

刘 昶, 王 锐, 邱根全, 孙喜才

刘昶, 王锐, 邱根全, 孙喜才, 西安交通大学第一医院中医科
陕西省西安市 710061

刘昶, 女, 1974-03-01 生, 天津市人, 汉族. 2003 西安交通大学消化化学博士
生, 主治医师, 主要从事中西医结合消化系统疾病的研究.

项目负责人: 刘昶, 710061, 陕西省西安市, 西安交通大学第一医院中医科.

liuyi.jiaotong@163.com

电话: 029-81987592

收稿日期: 2004-06-24 接受日期: 2004-08-30

Inhibition of Fuzheng Yiliuyin combined with various chemotherapeutic drugs on human gastric carcinoma cell lines

Yi Liu, Rui Wang, Gen-Quan Qiu, Xi-Cai Sun

Yi Liu, Rui Wang, Gen-Quan Qiu, Xi-Cai Sun, Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shannxi Province, China

Correspondence to: Yi Liu, Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shannxi Province, China. liuyi.jiaotong@163.com

Received: 2004-06-24 Accepted: 2004-08-30

Abstract

AIM: To study the inhibitory effects of Fuzheng Yiliuyin (FZYLY) combined with various chemotherapeutic drugs on human gastric carcinoma cell lines.

METHODS: Human gastric carcinoma cell lines, namely SGC-7901 and MGC-803, were treated with FZYLY, FZYLY combined with various kinds of chemotherapeutic drugs (including Vp-16, ADM, 5-FU, DDP) and chemotherapeutic scheme (including EAP and EFP) respectively. The inhibitory effects of various drugs on the two cell lines were observed by MTT method at 24h, 48h and 72h. Flow cytometry was used to detect the apoptotic rate of gastric carcinoma cells after 72 h. At the same time, transmission electron microscope was used to observe the ultrastructural changes of gastric carcinoma cells.

RESULTS: Obvious apoptosis was observed in the gastric carcinoma cells 72 h after treated with FZYLY. FZYLY combined with Vp-16, ADM, 5-FU, DDP and EAP and EFP schemes have the synergic inhibitory effects on the two kinds of cell lines, and the inhibitory effects increased with the duration of drug action. FZYLY combined with ADM had the worst synergic inhibitory effects on both SGC-7901 and MGC-803 (55.4 ± 4.8 vs 20.1 ± 5.5 , $t = 2.41$, $P = 0.02 < 0.05$; 50.7 ± 6.4 vs 14.8 ± 2.7 , $t = 2.42$, $P = 0.02 < 0.05$, compared with FZYLY, respectively. FZYLY combined with EFP chemotherapeutic scheme had better inhibitory effects on SGC-7901, and the inhibitory rates were $79.4 \pm 2.8\%$, $83.3 \pm 4.8\%$, $87.5 \pm 4.3\%$ after 24, 48 h and 72 h

respectively ($t = 2.85$, $P = 0.005 < 0.05$ vs FZYLY). The inhibition rates on MGC-803 cells of FZYLY combined with DDP were not significantly different from those of FZYLY combined with EFP scheme after 72 h, but their effects were both better than other groups. The synergic inhibitory effects on various cell lines were different when FZYLY was combined with various drugs.

CONCLUSION: FZYLY can induce apoptosis of gastric carcinoma cells. FZYLY has the synergic function with chemotherapeutic drugs, but the efficiency of synergic effects and the mechanism are different. FZYLY combined with one single drug and with chemotherapeutic scheme may have the similar effects. Different gastric carcinoma cell lines have different sensitivities to different combinations.

Liu Y, Wang R, Qiu GQ, Sun XC. Inhibition of Fuzheng Yiliuyin combined with various chemotherapeutic drugs on human gastric carcinoma cell lines. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11):2564-2567

摘要

目的: 研究扶正抑瘤饮及其配伍不同化疗药物后对体外人胃癌细胞的影响. 并探讨中药抑制人胃癌细胞增生的可能的作用机制.

方法: 取两株人胃癌细胞株 SGC-7901、MGC-803 细胞, 分别加入中药及其分别配伍不同的化疗药物及方案(包括化疗药物 Vp-16, ADM, 5-FU, DDP 以及化疗方案 EAP, EFP), 分别采用 MTT 法观察各组药物作用胃癌细胞 24 h, 48 h, 72 h 后对两种胃癌细胞增生的抑制作用. 并通过流式细胞仪测定各组药物作用胃癌细胞 72 h 后的胃癌细胞凋亡率和坏死率. 同时通过透射电镜观察中药作用 72 h 后的胃癌细胞的细胞超微结构的变化.

结果: 透射电镜下可以观察到中药引起胃癌细胞发生典型的凋亡细胞形态学的改变. 经 t 检验, 结果显示中药与 4 种化疗药物 2 种化疗方案联用 24, 48, 72 h 后, 对两株胃癌细胞均有协同抑制作用, 且随着药物作用时间的延长, 其协同抑制作用也增强. 中药与 ADM 联用对人胃癌细胞株 SGC-7901, MGC-803 的协同抑制作用均为最弱, 分别为 (55.4 ± 4.8 vs 20.1 ± 5.5 , $t = 2.41$, $P = 0.02 < 0.05$; 50.7 ± 6.4 vs 14.8 ± 2.7 , $t = 2.42$, $P = 0.02 < 0.05$). 其中中药与 EFP 化疗方案联用对 SGC-7901 细胞株协同抑制作用较强, 分别为 (79.4 ± 2.8 , 83.3 ± 4.8 , 87.5 ± 4.3 , $t = 2.85$, $P = 0.005 < 0.05$). 而中药与 DDP (70.2 ± 3.5 , 80.1 ± 3.6 , 84.3 ± 7.5 , $t = 2.42$, $P = 0.02 < 0.05$) 和与 EFP (82.6 ± 7.8 ,

87.5 ± 3.1 , 89.9 ± 4.8 , $t=2.96$, $P=0.005 < 0.05$)化疗方案联用对MGC-803细胞株的协同抑制作用较强.且中药与DDP和EFP化疗方案联用72 h对MGC-803细胞株的抑瘤率相近且高于其他治疗($P < 0.05$).中药与不同的化疗药物及方案联用,对不同分化程度的人胃癌细胞株所产生的协同增效作用不同.

结论:扶正抑瘤饮通过诱导细胞凋亡抑制肿瘤细胞的增生,并与化疗药物有协同效果,但与不同药物联用的协同效率和产生协同效果的机制不同.且中药与单药联用的抑瘤率不一定低于与化疗方案联用的抑瘤率.中药与化疗或与化疗方案联用对不同分化程度的胃癌的抑制作用也存在敏感性差异.

刘昉, 王锐, 邱根全, 孙喜才. 扶正抑瘤饮及其配伍不同化疗药物对人胃癌细胞增生的抑制作用. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2564-2567
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2564.asp>

0 引言

我们在应用扶正抑瘤饮体内治疗胃癌取得较好疗效的基础上^[1-2],进一步研究其抗癌机制.虽然大量的临床和实验研究报道,中药和化疗药物或化疗方案联用可以起到增效减毒的作用.但是中药与不同的化疗药物联用是否均有增效作用,以及中药对不同化疗的增效作用和增效机制间是否存在差异,均有待研究.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃低分化黏液腺癌细胞株MGC-803由西安交通大学第一医院分子生物中心提供;人胃中分化转移性腺癌细胞株SGC-7901由第四军医大学西京医院消化科提供;扶正抑瘤饮液由西安交通大学药理研究所生产,含生药2 g/L,处方:黄芪,白术,柴胡,三棱,莪术,汉三七,蒲公英,白花蛇舌草,仙鹤草,石上柏,炙甘草的浸提液;氟尿嘧啶(5-FU)由上海海普药厂生产;足叶乙甙(Vp-16)由连云港制药厂生产;顺铂(DDP)由河北德州制药厂生产;阿霉素(ADM)为Pharmacia and Upjohn公司产品.EAP化疗方案包括Vp-16, ADM, 5-FU; EFP化疗方案包括Vp-16, DDP, 5-FU. 细胞膜磷脂酰丝氨酸荧光素探针(Annexin-V-FITC)为Boehringer Mannheim公司产品;PI和MTT为Sigma公司产品.全自动酶联免疫检测仪为LabSystem公司产品;流式细胞仪为美国Coulter公司产品.

1.2 方法 胃癌细胞SGC-7901和MGC-803用含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养液,在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养,用2.5 g/L的胰蛋白酶消化传代.取对数生长期贴壁生长状态良好的人胃癌细胞SGC-7901和MGC-803,按 5×10^7 /L的密度接种于96孔无菌细胞培养板(200 μL/孔),放入37℃ 50 mL/L CO₂孵箱24 h后取出.吸弃上清液,以各组相应的药物和剂量加入培养孔中(200 μL/孔).每板分为6组(即培养液对照组、中

药与5-FU联合组,中药与Vp-16联合组,中药与ADM联合组,中药与DDP联合组,中药与EFP联合组,中药与EAP联合组),每组设3个复孔.中药浓度为1 mg/L. 5-FU, ADM, DDP, Vp-16浓度为能抑制30%人胃癌细胞增生的浓度(IC₃₀).加药后放回37℃, 50 mL/L CO₂孵箱共同孵育72 h后,各孔加入4 g/L四甲基偶氮唑蓝(MTT)20 μL孵育4 h,加入二甲基亚砜150 μL,混匀30 min后在全自动酶联免疫检测仪于570 nm波长测定A₅₇₀值(实验重复3次,取其均值)间接反映存活细胞数量.计算中药对人胃癌细胞的抑制率 $= (A_{\text{无药组}} - A_{\text{用药组}}) / A_{\text{无药组}} \times 100\%$.将与药物共同孵育72 h后的细胞,经洗涤收集后加入Annexin-V-FITC和PI混合液染色,用流式细胞仪检测凋亡细胞.另取与中药共同孵育72 h后的细胞,弃去培养液,用自制细胞刮刮下细胞,移入加入了4℃预冷PBS的尖底离心管中,离心15 min弃上清,加入4℃预冷的20 g/L戊二醛4 mL,进行透射电镜检测.

统计学处理 各组实验数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,用SPSS10.0统计软件进行t检验.

2 结果

2.1 人胃癌细胞株体外抑制率 中药联用不同的化疗方案均能增强对人胃癌细胞的抑制作用,但对两株胃癌细胞的敏感性不同,随着药物作用时间的延长,其抑瘤率也随之增大.对于SGC-7901细胞株而言,中药与EFP联用的抑瘤率较高.对于MGC-803细胞株而言,中药与DDP和EFP化疗方案联用抑瘤率相近且高于其他治疗($P < 0.05$,表1).

2.2 人胃癌细胞凋亡 中药联用不同的化疗药物及方案,对SGA-7901和MGC-803不同分化程度的人胃癌细胞株所产生的影响不同.他可以通过主要加强直接的细胞毒作用,也可以通过主要加强诱导细胞的凋亡提高某些化疗药物的抑瘤作用(表2).

2.3 人胃癌细胞透射电镜检测 癌细胞体积显著减小.大部分细胞肿胀变大,坏死,裂解.部分细胞核电子密度增高显著固缩,染色质呈大的团块状凝集,边缘化.并沿核膜浓聚成多形性高密度颗粒区.部分细胞胞质内细胞器崩解,线粒体肿胀变大,结构变得模糊不清.胞质内出现空泡变性(图1A, B).

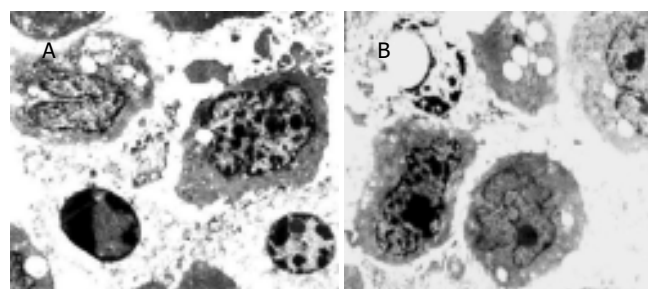


图1 扶正抑瘤饮作用胃癌细胞株72 h超微结构变化. A: SGC-7901细胞; B: MGC-803细胞.

表1 扶正抑瘤饮与化疗药物对胃癌细胞株抑瘤率(mean \pm SD%)

分组	SGA-7901			MGA-803		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
FZYLY	12.4 \pm 7.9	17.4 \pm 3.1	20.1 \pm 5.5	8.9 \pm 4.5	11.8 \pm 5.4	14.8 \pm 2.7
FZYLY+Vp-16	51.2 \pm 4.2 ^a	56.9 \pm 4.8 ^a	62.3 \pm 3.9 ^a	36.9 \pm 7.2 ^a	48.9 \pm 5.2	58.8 \pm 4.6 ^a
FZYLY+ADM	46.5 \pm 7.2 ^a	50.1 \pm 3.2 ^a	55.4 \pm 4.8 ^a	34.5 \pm 8.1 ^a	43.6 \pm 3.7	50.7 \pm 6.4 ^a
FZYLY+5-FU	57.8 \pm 2.6 ^a	61.9 \pm 6.3 ^a	69.9 \pm 8.4 ^a	40.7 \pm 6.6 ^a	50.8 \pm 4.7 ^a	55.7 \pm 3.2 ^a
FZYLY+DDP	53.6 \pm 2.4 ^a	58.4 \pm 1.7 ^a	67.4 \pm 5.7 ^a	70.2 \pm 3.5 ^a	80.1 \pm 3.6 ^a	84.3 \pm 7.5 ^a
FZYLY+EAP	61.2 \pm 3.3 ^a	68.5 \pm 3.9 ^a	71.5 \pm 3.4 ^a	73.8 \pm 4.6 ^a	72.2 \pm 4.1 ^a	74.9 \pm 3.4 ^a
FZYLY+EFP	79.4 \pm 2.8 ^a	83.3 \pm 4.8 ^a	87.5 \pm 4.3 ^a	82.6 \pm 7.8 ^a	87.5 \pm 3.1 ^a	89.9 \pm 4.8 ^a

^a $P < 0.05$ vs FZYLY 组.表2 扶正抑瘤饮与化疗药物联用 72 h 诱导人胃癌细胞坏死和凋亡(mean \pm SD%)

分组	SGA-7901			MGA-803		
	活细胞	坏死细胞	凋亡细胞	活细胞	坏死细胞	凋亡细胞
FZYLY	78.7 \pm 0.6	6.6 \pm 4.3	14.5 \pm 5.4	84.4 \pm 3.1	4.5 \pm 0.6	11.2 \pm 1.8
FZYLY+Vp-16	38.5 \pm 2.5	46.1 \pm 6.2	15.3 \pm 2.1	42.1 \pm 1.5	32.4 \pm 7.9	25.8 \pm 5.2
FZYLY+ADM	44.6 \pm 3.5	26.7 \pm 2.5	19.9 \pm 4.7	49.4 \pm 5.2	29.8 \pm 3.3	20.7 \pm 5.1
FZYLY+5-FU	29.6 \pm 4.1	44.7 \pm 9.9	25.6 \pm 1.2	44.3 \pm 8.2	30.5 \pm 7.4	25.3 \pm 4.6
FZYLY+DDP	32.3 \pm 11.7	63.6 \pm 10.6	4.1 \pm 3.0	16.1 \pm 7.5	60.9 \pm 8.1	23.0 \pm 0.6
FZYLY+EAP	27.6 \pm 5.8	55.5 \pm 10.5	16.8 \pm 7.4	25.0 \pm 2.9	65.4 \pm 5.8	9.6 \pm 2.3
FZYLY+EFP	13.1 \pm 2.7	66.3 \pm 12.0	20.7 \pm 6.6	11.1 \pm 3.6	67.8 \pm 4.1	20.9 \pm 4.9
空白对照	92.1 \pm 6.3	6.6 \pm 8.4	1.3 \pm 0.2	94.3 \pm 0.2	4.6 \pm 0.8	1.2 \pm 0.5

3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤^[3]晚期治疗很困难^[4-6],因而对胃癌的防治研究仍是目前的研究热点.近年大量研究表明中药方剂具有抗肿瘤作用^[7-8],并可诱导胃癌细胞凋亡和抑制胃癌细胞体外生长^[9-15].中药扶正抑瘤饮在肿瘤治疗领域有一定的价值^[11-21].研究表明化疗药物对不同病理学类型的胃癌的抑制作用存在敏感性差异^[16-17].我们的研究表明扶正抑瘤饮可通过引起坏死性细胞改变及诱导凋亡抑制体外胃癌细胞的增生,且主要通过诱导凋亡来抑制胃癌细胞的增生.但其对不同胃癌细胞生长抑制的效果存在明显的差异.抗癌药物联合应用有重要的临床意义.化疗药物的联用可以提高治疗胃癌有效率,并能降低了毒副作用.DDP^[18-20],EAP^[21-26],EFP^[27]都是临床治疗胃癌常用的化疗药物及方案.中药可增强化疗药物对多种肿瘤的治疗效果^[28-30].我们的研究表明,中药对不同的化疗药物或化疗方案均有增效胃癌作用.但他们引起的增效作用的效率不同.虽然对不同细胞株的增生的影响不同,但均随着作用时间的延长,抑制肿瘤细胞增生的效果加强.这部分解释了为什么临床上相同的中药与不同的化疗药物联用,或者相同的治疗方案,对有些患者效果好而对有些患者则效果差.这说明抗肿瘤中药与化疗方案联用也存在药物敏感性的问题.我们的研究结果还提示,中药与化疗方

案联用并不一定就能获得较与其某些单药联用更高的抑瘤率.因此在临床上应针对不同的肿瘤类型、不同的患者进行个体化的治疗.通过体外药敏试验,选择适当的化疗药物或化疗方案与抗肿瘤中药联用,并可以通过适当延长治疗时间以求提高疗效,减少毒副作用,获得最佳临床治疗效果.中药联用不同化疗药产生增效作用的机制也不同,有些是通过直接细胞毒作用,有些则是通过诱导细胞凋亡来实现.但其具体作用机制尚有待进一步阐明.

4 参考文献

- 1 邱根全,刘映,王锐,南克俊.扶正抑瘤饮抑瘤作用的实验研究.第四军医大学学报 2003;24:466-468
- 2 邱根全,王锐,南克俊,成涛,刘映,孙喜才.扶正抑瘤饮配合化疗治疗中晚期消化道肿瘤的临床研究.西安医科大学学报 2002;23:322
- 3 Wu K, Liu BH, Zhao DY, Zhao Y. Effect of vitamin E succinate on expression of TGF- β 1, c-jun and JNK1 in human gastric cancer SGC 7901 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001; 7:83-87
- 4 Xu DZ, Zhan YQ, Sun XW, Cao SM, Geng QR. Meta-analysis of intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:2727-2730
- 5 Wood LA, Fields AL. Chemotherapy in metastatic gastric cancer: population-based perceptions and practice patterns of medical oncologists. *Br J Cancer* 2004;90:1885-1887
- 6 Layke JC, Lopez PP. Gastric cancer: diagnosis and treatment options. *Am Fam Physician* 2004;69:1133-1140
- 7 钱士辉,王俏先,亢寿海,杨念云,袁丽红.陈皮提取物体外抗肿瘤作用的研究.中药材 2003;26:744-745

- 8 李士敏, 吴筱丹, 曾苏, 栾连军, 邵青. 海龙体外抗肿瘤活性研究. *中国中药杂志* 2001;26:198-200
- 9 Su M, Dai M, Lu X, Li H, Liu J. Effect of traditional Chinese medicine compounds Aining on the expression of apoptosis inducing genes of human gastric cancer cell. *Zhong Yao Cai* 2002;25:563-566
- 10 郭青龙, 赵丽, 尤启冬, 吴照球, 顾红燕. 藤黄酸诱导人胃腺癌 SGC-7901 细胞的凋亡作用. *中国天然药物* 2004;2:106-110
- 11 哈敏文, 董明, 王兰, 袁媛. 大蒜素协同抗癌药对肿瘤细胞杀伤作用的研究. *中国肿瘤临床* 2004;31:193-196
- 12 李昊, 杨慧萍, 杨凡, 鲁小青, 张虹, 陈百先. 藤梨根对胃癌细胞抑制作用的实验研究. *河北中医* 2004;26:314-315
- 13 Su M, Dai M, Lu X, Li H, Liu J. Morphological changes and inhibiting effect on human gastric cancer cell SGC-7901 caused by aining. *Zhong Yao Cai* 2002;25:339-342
- 14 Su M, Dai M, Lu X, Liu J, Li H. Apoptotic morphological changes and TUNEL of human gastric cancer cell SGC-7901 induced by aining. *Zhong Yao Cai* 2002;25:270-272
- 15 Ji YB, Gao SY, Ji HR, Kong Q, Zhang XJ, Yang BF. Anti-neoplastic efficacy of Haimiding on gastric carcinoma and its mechanisms. *World J Gastroenterol* 2004;10:484-490
- 16 魏寿江, 王崇树, 赵国刚, 侯华芳. 胃癌对化疗药物的敏感性与血型及病理学类型的相关性研究. *四川肿瘤防治* 2003;16:193-196
- 17 王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳. 不同消化道癌对化疗药物敏感性的应用研究. *世界华人消化杂志* 2004;12:997-999
- 18 Zhang WM, Xu GH, Ju AP, Zheng YT, Jiang Q. Clinical results of advanced gastric cancer patients treated with oxaliplatin-containing regimen. *Ai Zheng* 2003;22:1346-1348
- 19 Suganuma K, Kubota T, Saikawa Y, Abe S, Otani Y, Furukawa T, Kumai K, Hasegawa H, Watanabe M, Kitajima M, Nakayama H, Okabe H. Possible chemoresistance-related genes for gastric cancer detected by cDNA microarray. *Cancer Sci* 2003;94:355-359
- 20 Li Q, Feng FY, Han J, Sui GJ, Zhu YG, Zhang Y, Zhang ZH, Li L, Wang PH, Zhou MZ, Zhang YC. Phase III clinical study of a new anticancer drug atofludung. *Ai Zheng* 2002;21:1350-1353
- 21 Ueda Y, Sonoda Y, Fujiki H, Harada S, Kimura T, Itoh T, Imura K, Naito K, Nomura K, Taniwaki M, Yamagishi H. Mobilization of peripheral blood stem cells (PBSCs) after etoposide, adriamycin and cisplatin therapy, and a multimodal cell therapy approach with PBSCs in advanced gastric cancer. *Oncol Rep* 2004;12:323-332
- 22 Reichle A, Bolder U, Bataille F, Messmann H, Wagner H, Zaiss M, Wild P, Hofstadter F, Andreesen R, Jauch KW. A multimodal treatment approach including high-dose chemotherapy in very advanced gastric cancer: evidence for control of metastatic disease. *Bone Marrow Transplant* 2003;32:665-671
- 23 Menges M, Schmidt C, Lindemann W, Ridwelski K, Pueschel W, Jungling B, Feifel G, Schilling M, Stallmach A, Zeitz M. Low toxic neoadjuvant cisplatin, 5-fluorouracil and folinic acid in locally advanced gastric cancer yields high R-0 resection rate. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:423-429
- 24 Bar Sela G, Tsalic M, Gaitini D, Steiner M, Haim N. Etoposide, doxorubicin and cisplatin alternating with 5-fluorouracil, doxorubicin and high-dose methotrexate in patients with advanced adenocarcinoma of the stomach or the gastroesophageal junction. *J Chemother* 2002;14:623-626
- 25 Uchinami M, Horiuchi T, Aotake T, Matsumura M, Yokomachi J, Tanaka K, Tabo T, Tanigawa N. A gastric cancer patient with marked para-aortic lymph node metastasis surviving more than 10 years after aggressive operation and repeated EAP chemotherapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002;29:449-453
- 26 Bajetta E, Buzzoni R, Mariani L, Beretta E, Bozzetti F, Bordogna G, Aitini E, Fava S, Schieppati G, Pinotti G, Visini M, Ianniello G, Di BM. Adjuvant chemotherapy in gastric cancer: 5-year results of a randomised study by the Italian Trials in Medical Oncology (ITMO) Group. *Ann Oncol* 2002;13:299-307
- 27 Li AL, Li HY, Jin BF, Ye QN, Zhou T, Yu XD, Pan X, Man JH, He K, Yu M, Hu MR, Wang J, Yang SC, Shen BF, Zhang XM. A novel eIF5A complex functions as a regulator of p53 and p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 2004[Epub ahead of print]
- 28 Shen YH, Song MZ, Huang WX. Evaluation of therapeutic effects of traditional Chinese medicine combined with western medicine on breast cancer after resection: Analysis of 71 cases. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2003;1:30-31
- 29 Han MQ, Su JM, Huang HY, Long WH, Qin LP, Qin P, Liu W, Sheng ZY. Prognostic analysis of advanced non small cell lung cancer treated by sequential chemo-radiation therapy combined with traditional Chinese medicine: A report of 54 cases. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2003;1:195-198
- 30 Li LN, Liu WS, Xu K. Effect of combination of syndrome differentiation depending treatment and chemotherapy on prognostic factors in treating mid-late patients with non-small cell lung cancer. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2003;23:575-579

抗肝癌人源化单链抗体hscFv₂₅的体外亲和力成熟

孙志伟, 王 双, 杜威世, 俞炜源

孙志伟, 王双, 杜威世, 俞炜源, 军事医学科学院生物工程研究所
北京市 100071
孙志伟, 男, 1966-06-07 生, 黑龙江省海伦市人, 汉族, 1998 年第四军医大学博士, 副研究员。
国家自然科学基金资助, No. 30171065
项目负责人: 孙志伟, 100071, 北京市, 军事医学科学院生物工程研究所。
szwyh@263.net
电话: 010-66948829 传真: 010-63833521
收稿日期: 2004-08-30 接受日期: 2004-10-11

In vitro maturation of humanized single-chain Fv₂₅ against hepatocellular carcinoma

Zhi-Wei Sun, Shuang Wang, Wei-Shi Du, Wei-Yuan Yu

Zhi-Wei Sun, Shuang Wang, Wei-Shi Du, Wei-Yuan Yu, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30171065
Correspondence to: Zhi-Wei Sun, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China. szwyh@263.com
Received: 2004-08-30 Accepted: 2004-10-11

Abstract

AIM: To improve the affinity of humanized single-chain Fv (hscFv₂₅) against hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: HscFv₂₅ mutant antibody library was constructed, from which mutant antibodies with higher affinity were competitively selected. Then the selected antibodies were expressed in *E. coli* under the induction of isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG), and Cell ELISA and immunohistochemical staining methods were used to detect the activities of the mutant antibodies.

RESULTS: Three strains of mutant antibodies were obtained, and all of them could be solubly and effectively expressed in *E. coli*. One strain of the three mutant antibodies possessed the activity of its parental antibody and the affinity was about 60 times higher than its parental antibody.

CONCLUSION: The affinity of HscFv₂₅ mutant antibody against HCC can be successfully improved after screening.

Sun ZW, Wang S, Du WS, Yu WY. *In vitro* maturation of humanized single-chain Fv₂₅ against hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11):2568-2571

摘要

目的: 提高人源化抗肝癌单链抗体hscFv₂₅的亲和力。

方法: 设计并合成人源化抗肝癌单链抗体hscFv₂₅重链及轻链 CDR3 的半随机突变引物, 构建突变体抗体库, 竞争筛选亲和力更高的突变体抗体, 对所得的高亲和力的候

选抗体, 在大肠杆菌中进行可溶性表达, 并采用细胞 ELISA、细胞涂片免疫组织化学染色的方法, 对该抗体进行初步的活性鉴定。

结果: 得到了 3 株候选高亲和力突变体抗体, 其中的一株在大肠杆菌中获得了可溶性表达后, 进一步的活性检测结果表明, 该抗体的相对亲和力比亲本单链抗体提高了 60 倍左右, 同时该抗体对肝癌细胞(SMMC-7721)的免疫组织化学染色呈强阳性, 着色情况与亲本抗体相一致, 而对正常肝细胞(HL-02)染色呈阴性。

结论: 成功地构建了人源化抗肝癌单链抗体hscFv₂₅的突变体抗体库, 并筛选到了一株亲和力更高的突变体抗体。

孙志伟, 王双, 杜威世, 俞炜源. 抗肝癌人源化单链抗体 hscFv₂₅ 的体外亲和力成熟. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2568-2571
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2568.asp>

0 引言

抗体亲和力的高低是决定其临床体内应用价值的最重要因素之一. 对鼠源性基因工程小分子抗体进行人源化改造后或通过对抗体库筛选等所获得的抗体经常会存在抗体亲和力降低或较低的情况, 为提高这些抗体的实用价值, 就需要提高抗体的亲和力. 抗体的体外亲和力成熟是模拟体内抗体亲和力成熟过程, 通常采用错配 PCR 等手段将抗体基因进行突变, 利用噬菌体或细菌表面呈现技术, 构建突变体抗体库, 然后进行筛选, 以获得亲和力更高的抗体. mscFv₂₅ 是我们制备的一株鼠源性抗肝癌单链抗体, 在此基础上, 对其进行了人源化改造, 获得了人源化抗肝癌单链抗体(hscFv₂₅), 但 hscFv₂₅ 与 mscFv₂₅ 相比亲和力有所下降^[1], 因此我们对该抗体进行体外亲和力成熟, 以获得高亲和力的更具临床应用价值的抗肝癌人源化抗体。

1 材料和方法

1.1 材料 *E. coli* TG1、BL21(DE3)菌株为本室保存. 噬菌粒载体 pHB1 为本室保存, 表达载体 pTIG 为军事医学科学院生物工程研究所赵志虎副研究员惠赠, 该载体在 pET22b 基础上改造而来, 含促进可溶性表达的伴侣分子硫氧还蛋白基因(Trx), Trx 与下游抗体基因之间引入了翻译终止起始序列 TAAATG. IPTG、琼脂糖、SDS-PAGE 所用材料及限制性内切酶等, 购自 Sigma 公司. Taq DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶为 Promega

公司产品. 羊抗 M13 mAb 为 Pharmacia Biotech 公司产品. PCR 引物由上海生物工程公司合成, 构建突变体抗体库所用引物, PL: 5' -TTGCGGCCGCTTTGATCTCGACC TTGGTCCCTCCCAA(CX)(GX)(TX)(GX)(TX)(AX)(CX)(GX)(GX)(AX)(CX)(AX)(TX)(GX)(TX)(GX)(TX)(AX)(CX)(TX)(TX)(GX)(AX)(GX)(AX)GCAGAAATAAACTCCC AGATCCTC-3' (V_L 3' 端引物, 含轻链 CDR3 半随机突变, 3' 端引入 *NotI* 酶切位点), PH: 5' -GACC AGGGTGCCACAGCCCCA(GX)(TX)(AX)(AX)(GX)(AX)(GX)(AX)(GX)(GX)(GX)(TX)(CX)(CX)(CX)(AX)(CX)(CX)(AX)(AX)TCTTGACACAAGAATAGACCAC-3' (V_H 3' 端引物, 含重链 CDR3 半随机突变), P3: 5' -TGGG GCTGTGGCACCCTGGTCACC-3' (5' 端引物, 与 PL 为一对引物, 扩增 V_H 3' 端-Linker-V_L, 该引物与 PL 引物互补以便于通过重叠延伸 PCR 完成轻重链的拼接); P4: 5' -ACTCATGGCCCAG CCGGCCATGGAGGTA CAGCTGGTTGAATC-3' (V_H 5' 端引物, 5' 端引入 *SfiI* 酶切位点); 可溶性表达所用引物: P1: 5' -CGGAAT TCTAA ATGGAGGTACAGCTGTTGAATC-3' (V_H 5' 端引物, 引入 *EcoRI* 酶切位点和终止起始序列 TAAATG) 引物: P2: 5' -ATAGTTTACGCGCCGCGGTTCCAG CGGATCCGGATACGGCACCGGC GCACCTTTGATCTCG ACCTTGGTCCC -3' (V_L 3' 端引物, 含检测标签 E-tag 序列和 *NotI* 酶切位点).

1.2 方法

1.2.1 突变体抗体库的构建、筛选和鉴定 以 pTIG-hscFv₂₅ 为模板, PH 和 P4 为引物, PCR 扩增 V_H 突变体基因片段; 以 PL 和 P3 为引物, PCR 扩增 V_L 突变体基因片段. 上述两个 PCR 扩增片段进行重叠延伸 PCR, 扩增全长单链抗体突变体基因片段, 该片段用 *SfiI* 和 *NotI* 双酶切后与相同酶切的噬菌粒载体 pHB1 大片段连接, 连接产物电转化入 TG1, 37 °C 培养 1 h 后涂氯霉素抗性平板, 其中取少许按一定稀释度涂板计算库容量, 次日克隆长出后 LB 培养液刮洗下来, 调整菌液浓度, 使菌液 A₆₀₀ 为 1.0 左右, 加 150/L 甘油后分装, 与 -70 °C 冻存. 取菌液 1 mL 接种于氯霉素抗性的 2 × YT 培养液 100 mL 中, 37 °C 培养至 A₆₀₀ 值 0.5 左右, 加辅助噬菌体 M13KO7 超感染, 37 °C 培养 1 h 后加卡那霉素(终浓度 0.07 mg/L), 30 °C 培养过夜, 次日收集上清, 常规 PEG 沉淀, 获得突变体噬菌体抗体库. 测定滴度, 挑取 10 个克隆提质粒, *SfiI* 和 *NotI* 双酶切鉴定重组率. 收集 10⁷ 肝癌细胞(SMMC-7721), PBS 洗涤 3 次后, PBS 重悬细胞, 加亲本抗体的双价抗体(hscFv₂₅)₂ 4 °C 封闭靶抗原 2 h, PBS 洗涤 3 次, 加突变体抗体库(约 10¹² CFU), 37 °C 作用 30 min, 取细胞沉淀, 用含 0.5 mL/L 室温 20 °C 的 PBS 洗涤细胞 10 次, 破碎细胞, 取上清收集内化入细胞的噬菌体并测定滴度(亲本抗体为内化内化抗体)^[2]. 上述噬菌体同 10⁷ 正常肝细胞(HL-02) 37 °C 作用 1 h 以扣除非肝癌特异性抗体, 收集上清并测定滴度, 噬菌

体感染大肠杆菌 TG1, 并经 M13KO7 超感染, PEG 沉淀噬菌体, 完成第一轮筛选. 同上述过程进行第 2 轮和第 3 轮筛选, 挑取单克隆进行鉴定. 第 3 轮筛选后的数十个克隆分别经扩增培养、超感染、PEG 沉淀后得到噬菌体抗体克隆, 测定每个克隆的滴度. 细胞 ELISA 挑选阳性克隆. 细胞 ELISA 方法如下: 抗原细胞 SMMC-7721 及阴性对照细胞 HL-02 均按 1 × 10⁸/L 细胞 200 μL 铺 96 孔板, 待细胞长满后, 弃去培养液, PBS 洗涤 3 次后冷丙酮固定 5 min, 弃去固定液并吹干, PBS 洗涤 3 次. 800 mL/L 甲醇(含 3 mL/L H₂O₂)室温封闭内源性过氧化物酶 20 min, PBS 洗涤后 50 g/L 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h, 弃去封闭液加噬菌体抗体(约 10¹¹ CFU), 37 °C 作用 1 h, PBS 洗涤 10 次, 加 HRP 标记的羊抗 M13 mAb (1 : 5 000), 37 °C 作用 30 min, PBS 洗涤 10 次后 OPD 显色, 酶标仪测定 A_{492/630} 值. 用亲本单链抗体 hscFv₂₅ 的噬菌体抗体作为阳性对照, 挑选与 SMMC-7721 细胞作用 A_{492/630} 值高于阳性对照而与 HL-02 作用 A_{492/630} 值低的克隆为阳性克隆, 获得高亲和力候选突变体抗体(mhscFv₂₅)并进行序列测定.

1.2.2 候选抗体在大肠杆菌中的可溶性表达及活性鉴定 以上述候选抗体基因为模板, 以 P1 和 P2 为引物, PCR 扩增候选抗体基因, PCR 产物经胶回收后分别用 *EcoRI*、*HindIII* 酶切并与相同酶切的表达载体 pTIG 大片段进行连接, 构建重组表达载体 pTIG mhscFv₂₅, 转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细菌, 提取质粒并用 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切鉴定. 对酶切鉴定阳性克隆进行序列测定. 活化含重组表达载体 pTIG mhscFv₂₅ 的宿主菌 BL21(DE3), IPTG(终浓度为 0.2 mmol/L)于 28 °C 诱导表达 6 h, 离心收集菌体, 超声碎菌. 进行 12% SDS-PAGE 电泳鉴定, 含表达产物的碎菌上清用 Ni-NTA Agarose 进行亲和层析纯化(载体内含 6 × His), 纯化产物的纯度采用 SDS-PAGE 鉴定, Lowry 法定量. SMMC-7721 肝癌细胞及正常肝细胞 HL-02 铺 96 孔板, 经固定和封闭后, 以上述纯化的 mhscFv₂₅ 为一抗(做倍比稀释, 最高终浓度为 10 mg/L), 以鼠抗 E-tag 抗体为二抗, 以 HRP 标记的羊抗鼠抗体为三抗, 进行细胞 ELISA, 酶标仪测定 A_{492/630} 值, 达到饱和后的 A_{492/630} 值降低到 50% 时的抗体浓度表示 mhscFv₂₅ 的相对亲和力. 以亲本单链抗体 hscFv₂₅-E-tag 为平行对照. 同时设立正常肝细胞 HL-02 为阴性对照. 常规制备 SMMC-7721 肝癌细胞涂片, 以上述纯化产物为一抗, 以鼠抗 E-tag 抗体为二抗, 进行免疫组织化学染色. 对照设置: 以 hscFv₂₅-E-tag 为阳性对照, SGC-7901 胃癌细胞及 HL-02 细胞涂片作为无关抗原对照.

2 结果

2.1 突变体抗体库的构建、筛选及鉴定 为保证突变体抗体库的多样性, 我们在轻重链突变体基因进行重叠延伸 PCR 后没有进一步扩增, 直接克隆入噬菌粒载

体,电转化TG1细菌,计算库容量为 5×10^6 。随机挑取的10个克隆经 *Sfi*I 和 *Not*I 双酶切鉴定,均切出730 bp左右的片段(图1),与突变体抗体基因大小一致。转化菌经扩增、超感染和PEG沉淀后获得了噬菌体突变体抗体库,滴度为 8×10^{15} CFU/L。用来源于亲本单链抗体的Diabody竞争和正常肝细胞扣除,经三轮筛选获得 10^4 左右克隆,随机对其中的96个克隆进行了细胞ELISA鉴定,其中,在相同滴度的情况下,有48个克隆的 $A_{492/630}$ 值的比亲本单链抗体的噬菌体抗体高,而与正常肝细胞HL-02作用 $A_{492/630}$ 值低。选择其中3个高 $A_{492/630}$ 值的克隆作为高亲和力突变体抗体候选克隆,提取质粒并进行的序列测定表明,3株候选突变体抗体与亲本抗体比较,基因序列在CDR3发生了突变(表1),而框架区、CDR1及CDR2无变化,与突变体抗体库设计一致。这3个克隆分别被命名为 m_1hscFv_{25} 、 m_2hscFv_{25} 和 m_3hscFv_{25} 。以上述三株候选抗体基因为模板,分别以P1和P2为引物,PCR扩增候选抗体基因并分别克隆入表达载体pTIG,构建重组表达载体pTIG m_1hscFv_{25} 、pTIG m_2hscFv_{25} 和pTIG m_3hscFv_{25} ,经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切鉴定证实,抗体基因正确插入。对酶切鉴定阳性克隆进行序列测定证实序列正确,说明重组表达载体构建成功。将三个重组表达载体分别转化的宿主菌BL21(DE3),经IPTG诱导表达(以未诱导的同一菌株为对照),碎菌上清进行的120 g/L SDS-PAGE显示,约在 $M_r 30\ 000$ 处均出现1条新生蛋白带(图2),与目的蛋白的大小相一致,表达量均约占细菌裂解上清总蛋白量的10%左右,说明3株突变体抗体均获得可溶性表达。用可溶性表达上清进行的细胞ELISA结果显示, m_1hscFv_{25} 的亲和力稍高,因此对 m_1hscFv_{25} 的可溶性表达产物进行Ni柱(His亲和层析柱)纯化,纯度基本达到电泳纯。

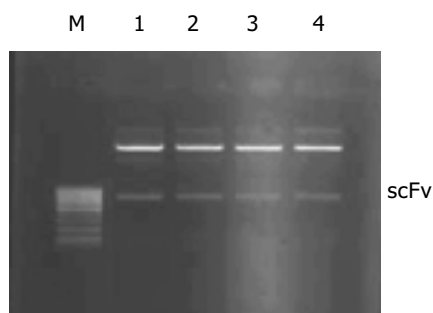


图1 抗体库噬菌粒 *Sfi*I 和 *Not*I 双酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳。M: 100 bp Lader; 1-4: 4个随机挑选的克隆。

表1 m_1hscFv_{25} 的CDR3序列与亲本抗体CDR3序列比较

	VH CDR3	VL CDR3
m_1hscFv_{25}	GKPWFY	QLWNYPLYT
$hscFv_{25}$	LVGPFSY	SQSTHVPYT

2.2 m_1hscFv_{25} 的相对亲和力和活性鉴定 m_1hscFv_{25} 与SMMC-7721肝癌细胞结合而与正常肝细胞HL-02不结合, $A_{492/630}$ 值降低50%时的 m_1hscFv_{25} 的浓度为0.04 mg/L,

$hscFv_{25}$ 的浓度为2.50 mg/L, m_1hscFv_{25} 的相对亲和力比亲本抗体高约60倍(图3)。 m_1hscFv_{25} 对SMMC-7721肝癌细胞涂片染色结果显示,抗原定位于细胞膜上,而且偏向一极,这与用亲本抗体的染色实验结果一致(图4)。HL-02细胞对照及胃癌细胞涂片对照均呈阴性。说明我们获得的 m_1hscFv_{25} 为功能性表达产物,保持了亲本抗体的特异性和亲和性。

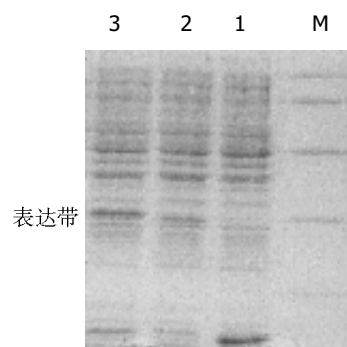


图2 重组 m_1hscFv_{25} 表达产物(碎菌上清)的SDS-PAGE。M: 蛋白质分子量标准($M_r \times 10^3$: 97, 66, 43, 30 and 21); 1: 未诱导宿主菌碎菌上清; 2: m_2hscFv_{25} ; 4: m_1hscFv_{25} 。

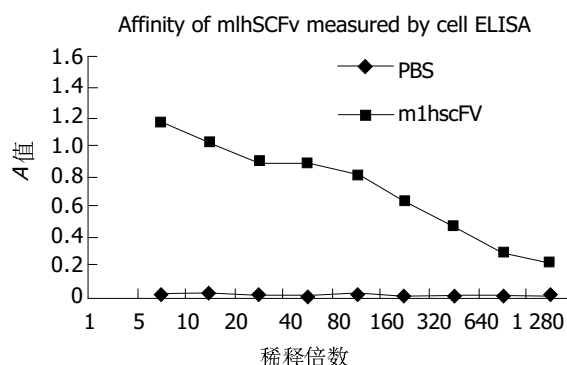


图3 细胞ELISA法 m_1hscFv_{25} 的相对亲和力的测定。



图4 m_1hscFv_{25} 对肝癌SMMC-7721细胞的免疫组织化学染色(S-P×400)。

3 讨论

在人体内,初次免疫反应产生的抗体亲和力一般都比较低,在抗原的不断刺激下,抗体可变区基因发生了体细胞突变,这些突变使得某些残基,特别是那些位于抗原结合位点的残基成为新的抗原接触残基,某些低亲和力接触残基被置换成高亲和力接触残基,某些接触抗原残基侧链位置可发生变化从而大大增加抗体

亲和性. 这种体细胞突变加上体内存在着优先选择高亲和力和抗体机制, 使得人体内随着抗原免疫过程的不断进行, 出现了大量可分泌高亲和力抗体的 B 细胞克隆, 这个过程称为体内亲和力成熟. 抗体具有较高的亲和力和特异性是抗体在临床应用的前提条件, 但目前从抗体库所获得的抗体或抗体经过人源化改造后, 往往存在亲和力不高或亲和力下降的情况, 因此必须提高其亲和力以提高其临床实用价值. 针对这一问题, 人们模拟抗体的体内亲和力成熟过程, 结合抗体库技术, 通过能够对外源基因产生高突变菌株的增生、错配 PCR (error-prone PCR)、DNA 交换 (链替换, DNA shuffling or chain shuffling) 或限定性突变 (parsimonious mutagenesis) 等方法^[3-5], 构建突变体抗体库, 优化筛选条件, 筛选亲和力更高的突变体抗体, 该过程就是抗体的体外亲和力成熟过程. 该技术也可用来改善抗体的特异性. 抗体的体外亲和力成熟突破了抗体体内亲和力成熟的界限, 能够使抗体的亲和力达到超自然的强度. 通过体外亲和力成熟, 可以将抗体的亲和力提高几倍甚至上千倍^[6-8].

抗体结合抗原的位点存在于抗体可变区 (尤其在重链的可变区), CDR 是抗体可变区中高突变部位, 也是与抗原直接接触的部位, 但在抗原、抗体结合时, 抗体中的 6 个 CDRs 通常不是全部参与与抗原结合, 而且 6 个 CDRs 与抗原结合的程度和重要性也各不相同. 由于 CDR3 不仅具有序列和长度的最大多样性, 而且 CDR3 残基还处于抗原结合位点中心, 因而通常 CDR3 残基

是决定抗体亲和力的主要因素. 因此抗体突变库的构建目前主要集中在 CDR 区尤其在重链 CDR3. 常采用人工合成寡核苷酸引入突变的方法, 引入的突变可完全随机也可有控制的限定性突变. 我们对 CDR3 采用了限定性突变的策略, 筛选到相对亲和力提高 60 倍左右的突变体抗体, 实现了该抗体的体外亲和力成熟, 为该抗体的进一步应用研究奠定了基础.

4 参考文献

- 1 袁清安, 黄翠芬, 俞炜源. 肝癌特异性鼠源及人源化单链抗体基因的构建及在大肠杆菌中的表达. *生物工程学报* 2000;16:86-90
- 2 隋延仿, 孙志伟, 陈志南. 肝癌免疫导向药物内在化及其意义. *中华医学杂志* 1996;76:845-847
- 3 Schaper RM. Mechanisms of mutagenesis in the *Escherichia coli* mutator mutD5: role of DNA mismatch repair. *Proc Natl Acad USA* 1988;85:8126-8130
- 4 Fromant M, Blanquet S, Plateau P. Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1995;224:347-353
- 5 Arnold FH, Wintrode PL, Miyazaki K, Gershenson A. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem Sci* 2001;26:100-106
- 6 Low NM, Holliger P, Winter G. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J Mol Biol* 1996;260:359-368
- 7 Jermutus L, Honegger A, Schwesinger F, Hanes J, Pluckthun A. Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:75-80
- 8 Boder ET, Midelfort KS, Wittrup KD. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10701-10705

乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因XTP12的克隆化

官嫚, 成军, 纪冬, 刘妍, 郭江, 王建军, 戴久增, 李筠

官嫚, 成军, 纪冬, 刘妍, 郭江, 王建军, 戴久增, 李筠, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

官嫚, 女, 1972-11-20生, 辽宁省丹东市人, 满族, 2003年解放军军医进修学院硕士生, 主治医师, 主要从事肝脏疾病的基础研究及临床工作。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队九五科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队十五科技攻关项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

Cloning of human gene XTP12 transactivated by X protein of hepatitis B virus

Man Gong, Jun Cheng, Dong Ji, Yan Liu, Jiang Guo, Jian-Jun Wang, Jiu-Zeng Dai, Jun Li

Man Gong, Jun Cheng, Dong Ji, Yan Liu, Jiang Guo, Jian-Jun Wang, Jiu-Zeng Dai, Jun Li, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C39970674, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, 100 Xisihuan Zhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2004-05-28 Accepted: 2004-09-30

Abstract

AIM: To screen and clone the target gene transactivated by hepatitis B virus (HBV) X protein and to pave the way for further elucidating the pathogenesis of HBV infection.

METHODS: The HBV X coding DNA fragment was amplified with polymerase chain reaction (PCR) technique using pCP10 plasmid containing the full length of HBV genome as the template. The expressive vector of pcDNA3.1-X was constructed by routine molecular biological methods. The HepG2 cells were transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-X respectively. The total mRNA was isolated and reversely transcribed. The cDNA was analyzed by DNA microarray and then target gene transactivated by hepatitis B virus (HBV) X protein was cloned by molecular biological technique.

RESULTS: After searching for homologous DNA sequences from GenBank, we found that one of the obtained sequences was a new gene with unknown function. Its full length was confirmed by PCR method. The new gene, amplified from the mRNA of HepG2 cells, consisted of 731 nucleotides (nt) and encoded 230 amino acids, and it was

named as XTP12 and registered in GenBank with the accession number AY598792.

CONCLUSION: The target gene is successfully cloned and it will pave the way for further study of the molecular mechanism of the transactivating effects of HBV X protein and the new therapy for chronic hepatitis B.

Gong M, Cheng J, Ji D, Liu Y, Guo J, Wang JJ, Dai JZ, Li J. Cloning of human gene XTP12 transactivated by X protein of hepatitis B virus. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11):2572-2575

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片技术及生物信息技术筛选并克隆乙型肝炎病毒(HBV)X蛋白反式激活新型靶基因, 进一步阐明HBV感染相关性疾病的发病机制。

方法: 以HBV X蛋白表达质粒pcDNA3.1(-)-X转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 提取总RNA进行逆转录, 对产物行基因表达谱芯片分析。应用分子生物学技术, 结合生物信息技术, 克隆HBV X反式激活作用的新的靶基因。

结果: 对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段。从HepG2细胞提取总RNA, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长序列, 并测序证实, 因其可以被X蛋白反式激活, 故命名为X蛋白反式激活蛋白12(XTP12), 已在GenBank中注册, 注册号: AY598792。PS2TP1基因的编码序列全长为731个核苷酸(nt), 编码产物由230个氨基酸残基(aa)组成。

结论: HBV X反式激活新靶基因被成功克隆, 为进一步研究HBV X蛋白的分子生物学机制和探索新型治疗技术奠定基础。

官嫚, 成军, 纪冬, 刘妍, 郭江, 王建军, 戴久增, 李筠. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因XTP12的克隆化. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2572-2575
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2572.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)基因组中最小的开放读码框架(ORF)编码的X蛋白(HBxAg)是一种具有反式激活(transactivation)作用的病毒蛋白, 在HBV感染肝细胞的恶性转化中具有十分重要的作用。HBxAg蛋白不仅对其自身的一些启动子的转录活性具有显著的影响,

而且对其他类型病毒的启动子以及肝细胞的基因启动子也可以产生影响, 改变肝细胞的基因表达谱^[1-6]。为了寻找HBxAg反式激活的新的靶基因, 我们应用基因芯片(DNA microarrays)技术, 对于HBxAg蛋白反式激活作用的靶基因进行筛选, 并应用生物信息学和逆转录PCR(RT-PCR)技术克隆X蛋白反式激活基因12(XTP12), 使进一步研究XTP12蛋白的生物学功能成为可能。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞及感受态大肠杆菌DH5 α (本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche), mRNA Purification试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), T7、SP6通用引物及pGEM-T载体(Promega), 细胞培养试剂(HyClone), DNA序列测定由上海联合基因公司完成。

1.2 方法 以含有2拷贝头尾连接的HBV DNA的质粒pCP10作为模板, 根据ayw亚型的HBV DNA序列设计、合成引物, 进行PCR扩增。扩增的HBxAg的编码基因首先克隆到TA载体中进行序列测定, 然后亚克隆到真核表达载体pcDNA3.1(-)中, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-HBxAg^[7]。肝母细胞瘤细胞系HepG2以DMEM完全培养基培养, 前1 d传代, 75%融合度的细胞, 应用FuGene 6脂质体转染试剂进行转染, 真核表达载体质粒DNA用量为2 μ g, 转染后48 h收获细胞^[8-10]。

1.2.1 基因芯片技术分析 应用Trizol试剂盒提取转染细胞的总RNA, 并进行逆转录^[11], 进行基因表达谱分析。包含1152个cDNA由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等。靶基因以0.5 g/L溶解于3 \times SSC溶液中, 用Cartesian公司的Cartesian 7500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样, 杂交及洗涤, 之后应用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片。用预先选定的内参照基因(24条管家基因, 每个基因点2个点, 共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正。用ImaGene 3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度, 计算Cy5/Cy3比值, 阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱。对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段。

1.2.2 新基因的PCR扩增与序列分析 根据电子拼接的新基因序列(731 bp), 利用生物软件Vector NTI设计新基因的序列特异性的含有特异性核酸内切酶EcoR I/BamH I(划线部分)引物(上游引物序列为: 5' GAA TTC ACC ACC TGT ATT TCA AAA TG-3', 下游引物序列为: 5' -GGA TCC CTG GTC AGT ACT CTA CTC TG-3'), 利用HepG2细胞来源的mRNA经过RT-PCR扩增所合

成的cDNA为模板, 放入9600PCR仪内进行扩增, 条件: 94 $^{\circ}$ C预变性2 min; 94 $^{\circ}$ C变性1 min, 60 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 35个循环, 再于72 $^{\circ}$ C延伸10 min。扩增产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳获得预期片段, 玻璃奶回收, 并与pGEM-T载体连接, 转化DH5 α 感受态细菌, 铺于含有氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上, 37 $^{\circ}$ C培养18 h。挑取白色菌落, 增菌, 使用碱裂解法提取质粒后进行双酶切(EcoR I/BamH I)鉴定, 证明目的基因约731 bp后测序, 进一步鉴定正确后获得阳性克隆。

2 结果

HBV X蛋白真核表达载体的构建及细胞转染经过限制性内切酶消化作图分析, 以及插入基因片段的核苷酸序列分析, 证实构建的真核表达载体正确。

2.1 基因芯片技术分析 经过基因芯片技术分析, 证实转染真核表达载体pcDNA3-HBxAg的HepG2细胞与转染空白载体pcDNA3.1(-)的HepG2细胞进行比较, 发现HBxAg蛋白上调的靶基因有16种, 下调的靶基因有58种。其中一个与已知基因没有同源性, 根据生物信息学进行电子拼接, 并考虑真核细胞编码基因Kozak原则及编码区多聚腺苷酸加尾信号, 确定新的基因编码序列。

2.2 新基因的序列分析和克隆化 在16种HBxAg上调的靶基因中, 其中包括未知功能基因, 利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物信息中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN), 获得HBxAg蛋白反式激活作用的新型靶基因, 利用生物软件Vector NTI设计引物, 利用HepG2细胞细胞来源的mRNA经过RT-PCR扩增所合成的cDNA为模板, 放入9600PCR仪内进行扩增, 获得该新基因的全长序列, 并测序证实, 此新基因命名为XTP12, 在GenBank中注册, 注册号为AY598792。XTP12基因的编码序列全长为731个核苷酸(nt)(图1), 编码产物由个氨基酸残基230个(aa)组成(图2)。

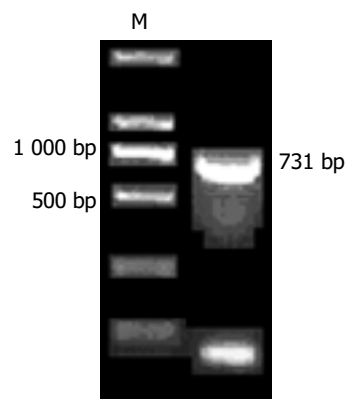


图1 XTP12基因PCR扩增产物电泳图。M: Marker。

	M	G	D	P	N	S	R	K	K	Q
1	ATG	GGG	GAC	CCA	AAC	TCC	CGG	AAG	AAA	CAA
	A	L	N	R	L	R	A	Q	L	R
31	GCT	CTG	AAC	AGA	CTA	CGT	GCT	CAG	CTT	AGA
	K	K	K	E	S	L	A	D	Q	F
61	AAG	AAA	AAA	GAA	TCT	CTA	GCT	GAC	CAG	TTT
	D	F	K	M	Y	I	A	F	V	F
91	GAC	TTC	AAG	ATG	TAT	ATT	GCC	TTT	GTA	TTC
	K	E	K	K	K	K	S	A	L	F
121	AAG	GAG	AAG	AAG	AAA	AAG	TCA	GCA	CTT	TTT
	E	V	S	E	V	I	P	V	M	T
151	GAA	GTG	TCT	GAG	GTT	ATA	CCA	GTC	ATG	ACA
	N	N	Y	E	E	N	I	L	K	G
181	AAT	AAT	TAT	GAA	GAA	AAT	ATC	CTG	AAA	GGT
	V	R	D	S	S	Y	S	L	E	S
211	GTG	CGA	GAT	TCC	AGC	TAT	TCC	TTG	GAA	AGT
	S	L	E	L	L	Q	K	D	V	V
241	TCC	CTA	GAG	CTT	TTA	CAG	AAG	GAT	GTG	GTA
	Q	L	H	A	P	R	Y	Q	S	M
271	CAG	CTC	CAT	GCT	CCT	CGA	TAT	CAG	TCT	ATG
	R	R	D	V	I	G	C	T	Q	E
301	AGA	AGG	GAT	GTA	ATT	GGC	TGT	ACT	CAG	GAG
	M	D	F	I	L	W	P	R	N	D
331	ATG	GAT	TTC	ATT	CTT	TGG	CCT	CGG	AAT	GAT
	I	E	K	I	V	C	L	L	F	S
361	ATT	GAA	AAA	ATC	GTC	TGT	CTC	CTG	TTT	TCT
	R	W	K	E	S	D	E	P	F	R
391	AGG	TGG	AAA	GAA	TCT	GAT	GAG	CCT	TTT	AGG
	P	V	Q	A	K	F	E	F	H	H
421	CCT	GTT	CAG	GCC	AAA	TTT	GAG	TTT	CAT	CAT
	G	D	Y	E	K	Q	F	L	H	V
451	GGT	GAC	TAT	GAA	AAA	CAG	TTT	CTG	CAT	GTA
	L	S	R	K	D	K	T	G	I	V
481	CTG	AGC	CGC	AAG	GAC	AAG	ACT	GGA	ATC	GTT
	V	N	N	P	N	Q	S	V	F	L
511	GTC	AAC	AAT	CCT	AAC	CAG	TCA	GTG	TTT	CTC
	F	I	D	R	Q	H	L	Q	T	P
541	TTC	ATT	GAC	AGA	CAG	CAC	TTG	CAG	ACT	CCA
	K	N	K	A	T	I	F	K	L	C
571	AAA	AAC	AAA	GCT	ACA	ATC	TTC	AAG	TTA	TGC
	S	I	C	L	Y	L	P	Q	E	Q
601	AGC	ATC	TGC	CTC	TAC	CTG	CCA	CAG	GAA	CAG
	L	T	H	W	A	V	G	T	I	E
631	CTC	ACC	CAC	TGG	GCA	GTT	GGC	ACC	ATA	GAG
	D	H	L	R	P	Y	M	P	E	*
661	GAT	CAC	CTC	CGT	CCT	TAT	ATG	CCA	GAG	TAG

图2 XTP12的核苷酸序列和编码产物的氨基酸残基序列。

3 讨论

基因芯片可以将极其大量的探针同时固定于支持物上,所以一次可以对大量的生物分子进行检测分析,从而解决了传统核酸印记杂交(southern blotting和northern blotting等)技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、低通量等不足。HBxAg蛋白在病毒复制、肝细胞癌变方面具有十分重要的作用,可反式激活病毒和细胞启动子进而调节病毒及细胞的转录,亦可调节细胞癌基因的表达和改变细胞的生长特性^[12-13]。HBxAg蛋白的奇特之处在于:结构简单,但却具有广泛的反式激

活作用。Nakatake *et al*^[14]对X基因的反式激活进行研究,结果为X基因终止密码子变异的HBV基因组转染HepG2后,病毒的复制水平下降;当与野生型X基因共转染时,病毒的复制水平将会得到恢复。Renner *et al*^[15]用含HBV增强子、C区启动子及CAT报告基因的质粒与X基因重组表达质粒共转染肝癌细胞PLC/PRF/5,同样也发现X基因可反式激活HBV增强子。HBxAg蛋白不仅可以上调HBV基因的复制能力,还可以影响细胞转录、生长以及细胞凋亡^[16]。目前认为HBxAg蛋白广泛的激活作用是由于其具有双重作用途径。HBxAg蛋白在细胞内定位于细胞质和核内^[17],对HBxAg反式激活途径目前研究认为存在两种方式,即:在胞质中通过信号传导途径,如:Ras-Raf-MAPK级连反应调节基因的表达^[18-20];在核内与TATA结合蛋白等相互作用而影响基因的表达。HBxAg蛋白还可以直接激活Src酪氨酸蛋白激酶的活性,Src激酶被激活后能刺激Ras-Raf-MAKP传导通路,促进c-Fos和c-Jun的合成,c-Fos和c-Jun以异二聚体的方式组成AP-1,AP-1直接结合序列特异的AP-1启动子上游反应元件,使转录水平上调。HBxAg蛋白细胞同时定位于胞质、胞核及其两种相对独立的反式激活途径,使其在HBV感染、HBV相关肝癌的发生和发展方面处于十分重要的地位,对其反式激活途径、方式进行深入的研究,有助于了解HCC发病机制,并对相应的治疗提供新的方法。

关于HBxAg的反式调节作用、对于肝细胞基因表达谱的影响等的研究还只能说刚刚开始,目前对于新克隆的HBxAg蛋白反式激活的靶基因的结构与功能、表达与调控,以及新基因的生物学作用和乙型肝炎致病机制中的作用和地位不明,需要进一步研究,以阐明新基因的研究意义^[21-22]。但是我们相信,HBxAg反式调节的一种新型靶基因XTP12基因的克隆为研究HBxAg的生物学功能开辟了新的方向。对XTP12生物学和医学意义的研究,必将促进在HBV感染后对HBxAg作用机制研究的深入。

4 参考文献

- 1 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 2 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 3 洪源, 成军. 肝炎病毒DNA疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:221-222
- 4 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒NS2基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 5 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调c-myc基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 6 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 7 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙型肝炎病毒X基因在真核细胞中的表达及反式激活SV40病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 8 柯亨宁, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹. HBsAg及其与小鼠白介素-18

- 融合蛋白表达质粒的构建和DNA免疫. 中华传染病杂志 2001; 19:77-80
- 9 成军, 李莉. 胸腺素 a1 在慢性病毒性肝炎治疗中的应用. 国外医学病毒学分册 2001;8:55-59
- 10 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 11 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 12 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10: 209-221
- 13 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:472-474
- 14 Nakatake H, Chisaka O, Yamamoto S, Matsubara K, Koshy R. Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* 1993; 195:305-314
- 15 Renner M, Haniel A, Burgelt E, Hofschneider PH, Koch W. Transactivating function and expression of the x gene of hepatitis B virus. *J Hepatol* 1995;23:53-65
- 16 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10: 15-18
- 17 Henkler F, Hoare J, Waseem N, Goldin RD, McGarvey MJ, Koshy R, King IA. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 4):871-882
- 18 Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276: 34671-34680
- 19 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001; 75:10348-10358
- 20 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Kumar V, Sarkar DP. An internal segment (residues 58-119) of the hepatitis B virus X protein is sufficient to activate MAP kinase pathways in mouse liver. *FEBS Lett* 2001;504:59-64
- 21 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003; 11:373-377
- 22 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:474-477

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(第四版)。本版核心期刊研究, 被列为“2001年国家社会科学基金项目”。该书定于2004年7月由北京大学出版社出版。

该书已于1992, 1996, 2000年出版过三版, 在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书。为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 开展了新一版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况。本版核心期刊定量评价, 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达51种, 统计文献量达到943万余篇次(1999-2001年), 涉及期刊1万2千种。本版还加大了专家评审力度, 1873位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1800种核心期刊, 分属七大编75个学科类目。该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书。

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关部门的百余名专家和期刊工作参加了研究。(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)

应用抑制性消减杂交技术筛选乙型肝炎病毒核心抗原反式调节基因

徐志强, 张鸿飞, 成军, 王建军, 刘妍, 纪冬

徐志强, 张鸿飞, 成军, 王建军, 刘妍, 纪冬, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

徐志强, 男, 主治医师, 中国人民解放军第302医院感染三科, 主要从事传染病临床与病毒性肝炎的发病机制研究。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-03-15 接受日期: 2004-10-18

Screening and identification of the target genes transactivated by hepatitis B virus core antigen

Zhi-Qiang Xu, Hong-Fei Zhang, Jun Cheng, Jian-Jun Wang, Yan Liu, Dong Ji

Zhi-Qiang Xu, Hong-Fei Zhang, Jun Cheng, Jian-Jun Wang, Yan Liu, Dong Ji, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Supported by National Natural Science Foundation, of China, No. C03011402, No. C30070690; and the 9.5 Research and Technique Foundation of Chinese PLA, No. 98D036; Returned Scholarship of General Logistics Department of Chinese PLA, No.98H038; the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of Chinese PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of Chinese PLA, No.01MB135.

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2004-03-15 Accepted: 2004-10-18

Abstract

AIM: To clone and identify human genes transactivated by hepatitis B virus core antigen (HBcAg) using suppression subtractive hybridization (SSH) technique.

METHODS: SSH and bioinformatic techniques were used for screening and cloning of the target genes transactivated by HBcAg protein. The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-HBcAg and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. After restriction enzyme *Rsa* I digestion, small fragments of cDNAs were obtained. Then tester cDNA was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA and underwent nested PCR twice, the product was subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplifi-

cation of the library was carried out with *E.coli* strain JM109. The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after PCR.

RESULTS: The subtractive library of genes transactivated by HBcAg was constructed successfully. The amplified library contains 33 positive clones. Colony PCR shows that these clones contain 200-800 bp inserts. The full-length sequences were obtained with bioinformatics method. Altogether 17 coding sequences were identified.

CONCLUSION: The obtained sequences may be the target genes transactivated by HBcAg, among which some genes are involved in cell cycle regulation, metabolism, and tumor immunity and development.

Xu ZQ, Zhang HF, Cheng J, Wang JJ, Liu Y, Ji D. Screening and identification of the target genes transactivated by hepatitis B virus core antigen. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2576-2580

摘要

目的: 筛选与克隆HBcAg反式调节基因, 了解其在体内的调节功能线索及机制。

方法: 以分子生物学技术构建HBcAg的真核表达载体pcDNA3.1(-)-HBcAg, 以表达质粒pcDNA3.1(-)-HBcAg转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA并逆转录为cDNA, 经*Rsa* I酶切后, 将实验组cDNA分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组cDNA进行两次消减杂交及两次抑制性聚合酶链反应(PCR), 将产物与T/A载体连接, 构建cDNA消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆PCR扩增后进行测序及同源性分析。

结果: 成功构建人HBcAg激活基因差异表达的cDNA消减文库。文库扩增后得到33个阳性克隆, 进行菌落PCR分析, 均得到200-800 bp插入片段。对插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序列, 结果共获得17种编码基因。

结论: 筛选到的cDNA全长序列, 包括一些与细胞生长调节、物质代谢及肿瘤发生密切相关的蛋白编码基因, 推测了HBcAg在体内可能存在的调控机制的线索, 尚需进一步的实验证明。

徐志强, 张鸿飞, 成军, 王建军, 刘妍, 纪冬. 应用抑制性消减杂交技术筛选乙型肝炎病毒核心抗原反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2576-2580
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2576.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种嗜肝性部分双链DNA病毒,他严重危害人类的健康,不仅引起急、慢性病毒性肝炎,而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关^[1]. HBcAg是由HBV DNA C基因区编码的一种结构性蛋白,有保守的三维结构,可因血清型不同而有183–185个氨基酸残基(aa),在乙型肝炎病毒(HBV)的生活周期中,病毒核心抗原(HBcAg)、病毒mRNA和DNA聚合酶共同构成核心颗粒,在核心颗粒中完成病毒DNA的合成^[2–3]. 抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)是1990年代后期建立的一种基因克隆的新技术,可以快速有效地检测到差异表达的基因^[4]. 我们应用SSH技术,构建HBcAg激活相关基因差异表达的cDNA消减文库,筛选相关的靶基因片段,并应用生物信息学(bioinformatics)技术获得其基因全长序列,为研究HBcAg在HBV感染后病毒致病过程中的作用提供一定的线索.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞及感受态大肠杆菌JM109(本室保存),pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); FuGENE6转染试剂(Roche), mRNA Purification试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒, 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6通用引物及pGEM-Teasy载体(Promega).

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增与纯化 以质粒pCP10中所含的HBV ayw亚型的DNA序列为模板,用PCR方法扩增HBcAg基因片段. 上游引物为: 5' -GCT AGC CAT GGA CAT CGA CCC TTA TA - 3', 下游引物为: 5' -GGT ACC CTA ACA TTG AGG TTC CCG AG - 3'. PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳,切胶,以GeneClean II kit (Bio 101公司)回收纯化550 bp DNA条带.

1.2.2 真核表达载体的构建、纯化和DNA测序 以T-A克隆法,用T4 DNA连接酶(Invitrogen公司)将目的基因片段插入载体pGEM-Teasy,电泳鉴定插入基因片的方向性. 将获得的质粒T-HBcAg和真核表达载体pcDNA3.1(-)分别用Kpn I和Nhe I双酶切,用T4 DNA连接酶进行定向连接,产物转化DH5 α 细菌,筛选抗氨苄青霉素阳性菌落;提取质粒,酶切及PCR鉴定含有HBcAg基因的阳性克隆,命名为pcDNA3.1(-)-HBcAg. DNA测序由上海博亚公司完成

1.2.3 细胞转染及细胞mRNA提取 用FuGENE6转染试剂将2 μ g pcDNA3.1(-)-HBcAg及pcDNA3.1(-)空载体分别转染35 mm平皿HepG2细胞,48 h后收获细胞. 使用mRNA Purification试剂盒,直接提取转染了核心表达质粒及空载体的HepG2细胞mRNA,经琼脂糖凝胶

电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2.4 双链cDNA(dscDNA)合成 用Clontech公司的PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit中的试剂,以获得的mRNA为模板逆转录合成cDNA.

1.2.5 消减杂交文库的建立 采用Clontech公司的PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit,常规SSH方法按说明书进行:转染了HBcAg表达质粒及空载体的HepG2细胞cDNA分别标记为Tester和Driver,经Rsa I(一种识别4碱基序列的内切酶)消化,产生相对较短的平端片段,纯化酶切产物. 将Tester的cDNA分为两份,分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头Adapter 1和Adapter 2,然后与过量的Driver cDNA进行杂交;合并两种杂交产物后再与Driver cDNA作第2次杂交;然后将杂交产物做选择性PCR扩增,使Tester cDNA中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增.

1.2.6 克隆鉴定分析 扩增产物与pGEM-Teasy载体连接,转化JM109感受态细菌,在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上,37 °C培养18 h. 挑取白色菌落,增菌,以pGEM-Teasy载体多克隆位点两端T7/SP6引物进行菌落PCR扩增,证明含有插入片段后(100–1 000 bp),测序(上海博亚公司). 应用生物信息学将测得序列GenBank数据库进行同源性分析.

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定 pcDNA3.1(-)-HBcAg载体经Kpn I/Nhe I双酶切鉴定可见550 bp的HBcAg基因DNA条带,证明载体构建正确(图1).

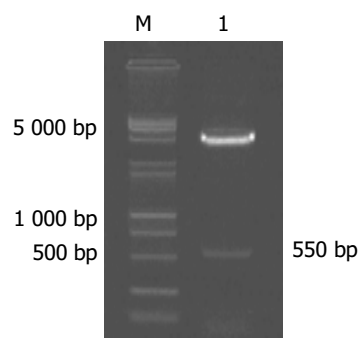


图1 pcDNA3.1(-)-HBcAg载体经Kpn I/Nhe I双酶切电泳图.

2.2 mRNA的定性定量分析 使用高质量的mRNA是保证cDNA高产量的前提. 紫外分光检测显示,转染了pcDNA3.1(-)-HBcAg质粒及空载体的HepG2细胞mRNA分别为4.53 μ g和4.12 μ g, $A_{260}/A_{280} = 1.82$. 10 g/L琼脂糖凝胶电泳见mRNA为大于0.5 kb清晰慧尾片状条带.

2.3 dscDNA两端连接效率检测 dscDNA与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 将连接有adaptor 1和Adaptor 2的两组dscDNA分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶G3PDH引物)进行28个循环扩增,产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳

鉴定.结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当,说明 dscDNA 已与接头高效率连接.

2.4 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 分别取1 μ L 抑制性及非抑制性PCR产物为模板,用看家基因G3PDH引物进行PCR扩增,分别在18, 23, 28, 33次循环结束时从体系中吸取5 μ L进行电泳鉴定.结果显示:与非抑制性PCR产物相比,抑制性PCR产物中G3PDH基因产物大大减少,说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图2).

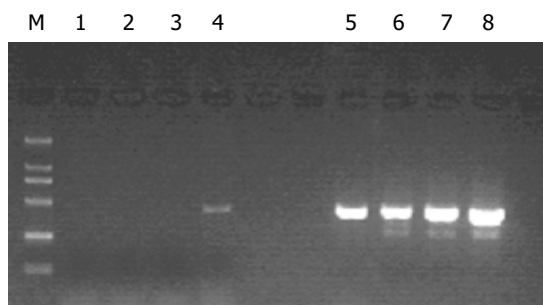


图2 消减效率分析结果. 1-4: 消减组, 引物为 G3PDH3、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 未消减组, 引物为 G3PDH3 5', CR 循环次数分别为 18、23、28、33.

2.5 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮PCR扩增后,扩增产物与pGEM-Teasy载体连接,转化JM109感受态细菌后有较多菌落生长,以pGEM-Teasy载体多克隆位点两端T7/SP6引物进行菌落PCR扩增,结果显示为200-1 000 bp大小不等的插入片段,所获得的克隆中几乎均含有插入片段,这些条带可能代表差异表达的基因片段(图3).

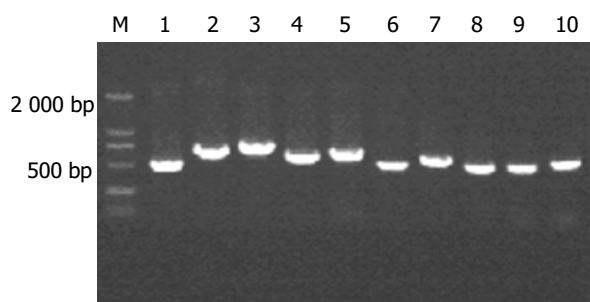


图3 部分克隆菌落PCR 鉴定电泳图

2.6 cDNA 测序与同源性分析初步结果 随机选择33个克隆测序,与GenBank数据库进行初步比较,与已知基因的部分序列高度同源(96-100%),详细结果(表1).

3 讨论

HBcAg有鱼精蛋白样亲胞核性的羧基末端,可介导细胞核内转运信号,使大量HBcAg进入细胞核内,而其他嗜肝DNA病毒的核壳蛋白都不向核内转运,人肝细胞核内HBcAg的功能不明.在病毒成熟过程中,核壳和外膜相互作用,形成病毒颗粒分泌的信号^[5-6].HBcAg具

表1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

同源蛋白基因	同源菌株	同源性
核糖体蛋白	10	98-100
线粒体单倍型	4	96-98
真核翻译延长因子1	3	99-100
铁蛋白	1	98
脂肪酸辅酶A连接酶长链4	1	97
载脂蛋白B	1	98
磷酸甘油酸激酶1	1	99
原癌受体	1	96
父系表达基因10	2	96-98
推定蛋白	1	99
肌动蛋白	1	99
肿瘤相关抗原L6	2	99-100
转酮醇酶	1	100
DNA反式激活多聚酶蛋白3	1	100
肿瘤排斥抗原(gp96)	1	96
公认的翻译启动因子	1	100
人染色体克隆	1	98

有保护病毒 mRNA,防止其被RNA酶降解的作用,对于乙肝病毒前基因组RNA的装配、基因组DNA的合成具有重要的作用. HBcAg有高免疫原性,HBcAg与HBsAg一同为细胞毒性T细胞(CTL)识别的主要靶抗原,对于HBcAg的免疫应答在病毒清除中可能有重要作用. HBcAg既可作为T细胞依赖性抗原,也可作为非T细胞依赖性抗原,诱导强烈CTL应答^[7],B细胞刺突尖部有HBcAg的抗原决定簇,可产生相应的体液免疫反应^[8],几乎所有HBV感染者均产生抗-HBc,对HBcAg的免疫应答在病毒清除中可能有重要作用^[9-10].HBcAg在HBV的装配和致病机制中是必不可少的,通过寻找肝细胞中HBcAg的相互作用蛋白,并进一步探明其机制,对与弄清HBcAg在HBV感染损伤中所起的具体作用,寻找有效控制和阻断HBV感染蔓延的方法有着重要意义^[11].

抑制性消减杂交方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术,与传统的方法比较,具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点,能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因,可以在较短的时间内获得较理想的实验结果^[12].我们将真核表达载体pcDNA3.1(-)-HBcAg转染肝母细胞瘤细胞系HepG2,并以转染pcDNA3.1(-)空白载体的相同细胞系作为对照,以2种转染的细胞系中提取的mRNA为起始材料,应用SSH方法成功地构建了HBcAg激活相关基因差异表达的cDNA消减文库,随机挑选33个克隆测序分析均为已知基因的序列且与GenBank中数据高度同源(96-100%).

在已知功能基因序列中,主要包括以下几种类型:(1)细胞内结构与细胞生长相关蛋白,如核糖体蛋白、线粒体蛋白、肌动蛋白、真核翻译延长因子等,在

细胞生长、分化、黏附中起重要作用. 真核翻译启动因子、DNA 反式激活多聚酶蛋白 3 与细胞的转录、翻译功能密切相关; (2) 参与细胞内物质代谢的蛋白基因. 如脂肪酸辅酶 A 连接酶长链 4^[13]、磷酸甘油酸激酶 1 (PGK1)、载脂蛋白 B (ApoB)、转酮醇酶在糖、脂肪、氨基酸的代谢方面具有各种作用. 载脂蛋白是位于脂蛋白表面的蛋白质, ApoB^[14-15]所载的主要脂蛋白为低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白. 参与 VLDL 的合成、装配和分泌与血脂水平和冠心病有关. ApoB 可促进脂蛋白与细胞膜表面受体间的结合, 帮助低密度脂蛋白-胆固醇进入动脉壁细胞形成动脉粥样硬化. 因此与致动脉粥样硬化作用有着密切的关系, 如果 ApoB 的含量增高, 则表明可能存在动脉粥样硬化. ApoB 分子数量的增加, 使分泌入胆汁的胆固醇增多, 增加了胆汁致石性, 与胆固醇结石形成有关. 铁蛋白是体内主要储存铁的蛋白质, 与体内铁的代谢密切相关. 有研究发现肝脏中其水平的升高为抵抗氧化应激损伤的机制之一^[16], 近来还有研究认为铁蛋白重链基因有抗凋亡作用, 可以使肝脏免受缺血性损伤^[17], 所以推测在本实验中其表达水平的升高可能与机体对抗病毒蛋白的刺激有关. (3) 肿瘤发生. 父系表达基因 10 (PEG10)^[18-20]虽然在正常肝细胞内不表达, 但在大多数肝细胞癌样本中表达升高, PEG10 在肝细胞再生和肝细胞癌发生中具有重要作用, 认识 PEG10 的分子基础为肝病的发展提供了新的线索, 开发抑制 PEG10 活性的药物可能是治疗肝细胞癌的新的方法. PGK1 除参与糖的分解代谢外, 对抗肿瘤治疗也有影响^[21], PGK1 的过量表达可导致对多种抗肿瘤药物的抵抗, 对紫杉醇的抵抗增加 30 倍, 对长春新碱、阿霉素、米托蒽醌亦有交叉抵抗, 但对氨甲蝶呤、顺铂无抵抗, PGK1 的这种作用成为抗癌药物治疗的重要障碍. 转酮醇酶^[22-24]的刺激剂能够促进肿瘤的生长、增生和对化学药物治疗的抗药性, 而转酮醇酶的抑制药对肿瘤细胞的作用相反. 肿瘤相关抗原 L6 (TAL6)^[25-26]表达于大多数上皮细胞癌, 并作为抗体介导治疗的靶抗原, 特异的抗 TAL6 的单克隆抗体能够有效地减少肺癌细胞的浸润和转移, 而肺鳞状细胞癌患者 TAL6 表达升高预示着手术后复发和生存率降低. 抗原癌受体的单克隆抗体介导 Jurkat 细胞内肿瘤样细胞的死亡^[27-28]. 肿瘤排斥抗原^[29-30]与体内的抗肿瘤免疫相关.

通过对上述 HBcAg 基因差异表达基因文库部分基因的分析, 我们发现 HBcAg 在细胞内表达后, 部分涉及细胞生长、分化、物质和能量代谢、信号传导、肿瘤发生等方面的基因表达增加, 提示 HBcAg 对体内的多个系统可能有影响. 本实验只是对 HBcAg 对人细胞激活相关基因进行了初步的筛选分析, 为研究 HBV 在体内的致病机制提供了新的线索. 有关激活基因的具体作用方式, 仍需要进一步的实验来证实.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83-88
- 2 Pumpens P, Grens E. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development. *FEBS Lett* 1999;442:1-6
- 3 Le Pogam S, Shih C. Influence of a putative intermolecular interaction between core and the pre-S1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus. *J Virol* 2002;76:6510-6517
- 4 Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6025-6030
- 5 Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, Belnap DM, Steven AC, Wingfield PT. The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO J* 2002;21:876-884
- 6 Karpenko LI, Ivanisenko VA, Pika IA, Chikaev NA, Eroshkin AM, Veremeiko TA, Ilyichev AA. Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble. *Amino Acids* 2000;18:329-337
- 7 Livingston BD, Crimi C, Fikes J, Chesnut RW, Sidney J, Sette A. Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules. *Hum Immunol* 1999;60:1013-1017
- 8 Lazdina U, Cao T, Steinbergs J, Alheim M, Pumpens P, Peterson DL, Milich DR, Leroux-Roels G, Sallberg M. Molecular basis for the interaction of the hepatitis B virus core antigen with the surface immunoglobulin receptor on naive B cells. *J Virol* 2001;75:6367-6374
- 9 Marinos G, Torre F, Chokshi S. Induction of T-helper cell response to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B: a major factor in activation of the host immune response to the hepatitis B virus. *Hepatology* 1995;22:1040-1049
- 10 Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. *J Clin Immunol* 2003;23:223-232
- 11 Cheng J, Wang L, Li K, Lu YY, Liu Y, Duan HJ, Hong Y, Wang G, Li L, Zhang LX. Cloning and expression of the gene of augmenter of liver regeneration in yeast cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:87-91
- 12 Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV, Weigel RJ. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1116-1123
- 13 Cao Y, Traer E, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Cloning, expression, and chromosomal localization of human long-chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4). *Genomics* 1998;49:327-330
- 14 Chiodini BD, Barlera S, Franzosi MG, Beceiro VL, Introna M, Tognoni G. APO B gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis. *Atherosclerosis* 2003;167:355-366
- 15 Qureshi AI, Giles WH, Croft JB, Guterman LR, Hopkins LN. Apolipoproteins A-1 and B and the likelihood of non-fatal stroke and myocardial infarction-data from The third national health and nutrition examination survey. *Med Sci Monit* 2002;8:CR311-316
- 16 Erario MA, Gonzales S, Noriega GO, Tomaro ML. Bilirubin and ferritin as protectors against hemin-induced oxidative stress in rat liver. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002;48:877-884
- 17 Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, Shen X, Busuttil RW, Yamashita K, Csizmadia E, Tyagi S, Otterbein LE, Brouard S, Tobiasch E, Bach FH, Kupiec-Weglinski JW, Soares MP. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *FASEB J* 2003;17:1724-1726

- 18 Tsou AP, Chuang YC, Su JY, Yang CW, Liao YL, Liu WK, Chiu JH, Chou CK. Overexpression of a novel imprinted gene, PEG10, in human hepatocellular carcinoma and in regenerating mouse livers. *J Biomed Sci* 2003;10:625-635
- 19 Okabe H, Satoh S, Furukawa Y, Kato T, Hasegawa S, Nakajima Y, Yamaoka Y, Nakamura Y. Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinogenesis through interaction with SIAH1. *Cancer Res* 2003;63:3043-3048
- 20 Ono R, Kobayashi S, Wagatsuma H, Aisaka K, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. *Enomics* 2001;73:232-237
- 21 Duan Z, Lamendola DE, Yusuf RZ, Penson RT, Preffer FI, Seiden MV. Overexpression of human phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) induces a multidrug resistance phenotype. *Anticancer Res* 2002;22:1933-1941
- 22 Cascante M, Centelles JJ, Veech RL, Lee WN, Boros LG. Role of thiamin (vitamin B-1) and transketolase in tumor cell proliferation. *Nutr Cancer* 2000;36:150-154
- 23 Schenk G, Duggleby RG, Nixon PF. Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1297-1318
- 24 Kochetov GA. Functional flexibility of the transketolase molecule. *Biochemistry (Mosc)* 2001;66:1077-1085
- 25 Kao YR, Shih JY, Wen WC, Ko YP, Chen BM, Chan YL, Chu YW, Yang PC, Wu CW, Roffler SR. Tumor-associated antigen L6 and the invasion of human lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:2807-2816
- 26 Kaneko R, Tsuji N, Kamagata C, Endoh T, Nakamura M, Kobayashi D, Yagihashi A, Watanabe N. Amount of expression of the tumor-associated antigen L6 gene and transmembrane 4 superfamily member 5 gene in gastric cancers and gastric mucosa. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3457-3458
- 27 Ma F, Zhang C, Prasad KV, Freeman GJ, Schlossman SF. Molecular cloning of porimin, a novel cell surface receptor mediating oncotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9778-9783
- 28 Zhang C, Xu Y, Gu J, Schlossman SF. A cell surface receptor defined by a mAb mediates a unique type of cell death similar to oncosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6290-6295
- 29 Harada K, Yamada A, Yang D, Itoh K, Shichijo S. Binding of a SART3 tumor-rejection antigen to a pre-mRNA splicing factor RNPS1: a possible regulation of splicing by a complex formation. *Int J Cancer* 2001;93:623-628
- 30 Yutani S, Shichijo S, Inoue Y, Kawagoe N, Okuda K, Kurohiji T, Tanaka M, Sata M, Itoh K. Expression of the SART1 tumor-rejection antigen in hepatocellular carcinomas. *Oncol Rep* 2001;8:369-372

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 2005 年由半月刊改为周刊

本刊讯 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 以及日益增多的国际科技交流的需要, 从2005年开始, *World Journal of Gastroenterology*(WJG)由半月刊改为周刊出版. 每月7, 14, 21, 28日出版, 50元/期, 全年48期, 邮发代号82-261, 北京报刊发行局发行. 2002-10-11获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金. 2003-01获得第二届国家期刊奖百种重点期刊. 2003-01-15由月刊改为半月刊. 2003-04-15 WJG(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)全文电子版免费开通, 截至2004-06-15点击次数为1816277. 2003-04-15世界胃肠病学杂志社稿件处理系统开发成功, 并开始使用. 作者通过用户名和密码在网上查找到稿件的全部处理记录. 2004-05-06自然出版集团出版的《*Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*》收录WJG. 经过多项学术指标综合评定及同行多位专家评审推荐, WJG被收录为国家科技部中国科技论文统计源期刊和中国科技核心期刊, 时间为2004-03/2006-03. 1998-01-15 / 2004-03-01 ISI SCI 收录期刊389种引用WJG出版的论文687篇分布39个国家. 引用WJG的SCI高影响因子期刊包括自然医学28.740(Nature Medicine), 细胞27.254(Cell), 自然神经科学综述24.047(Nature Reviews Neuroscience), 自然细胞生物学20.699(Nature Cell Biology), 基因与发育(Genes & Development)18.772, 柳叶刀15.397(Lancet), 自然神经科学14.857(Nature Neuroscience), 神经元13.846(Neuron), 自然癌症综述13.625(Nature Reviews Cancer), 胃肠病学13.440(Gastroenterology), 肝脏学9.825(Hepatology), 等国际顶级期刊. 引用WJG的作者分布于687个机构, 其中包括华盛顿大学医学院(Washington Univ, Sch Med), 耶鲁大学(Yale Univ), 康奈尔大学(Cornell Univ), 明尼苏达大学(Univ Minnesota), 斯坦福大学医学中心(Stanford Univ, Ctr Med), 加州大学旧金山分院(Univ Calif San Francisco), 美国国立卫生研究院(National Institute of Health), 伦敦帝国大学等国际著名大学或研究机构. 2004-06-11被CAB Abstracts, CAB Global Health收录.(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

乙型肝炎病毒全S蛋白反式激活蛋白1基因的克隆化

白桂芹, 成 军, 刘 妍, 吴顺华, 蔺淑梅, 黄燕萍, 张树林

白桂芹, 成军, 刘妍, 吴顺华, 蔺淑梅, 黄燕萍, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
白桂芹, 女, 1969-06-02, 陕西省西安市人, 汉族, 西安交通大学第一医院内科学博士, 主要从事病毒性肝炎的发病机制的研究。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

Cloning of human gene 1 transactivated by complete surface protein of hepatitis B virus

Gui-Qin Bai, Jun Cheng, Yan Liu, Shun-Hua Wu, Shu-Mei Lin, Yan-Ping Huang, Shu-Lin Zhang

Gui-Qin Bai, Jun Cheng, Yan Liu, Shun-Hua Wu, Shu-Mei Lin, Yan-Ping Huang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Shu-Lin Zhang, Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of Chinese PLA
Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuan Zhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2004-05-28 Accepted: 2004-09-30

Abstract

AIM: To screen and clone the target genes transactivated by complete surface protein of hepatitis B virus (HBV) and to pave the way for further elucidating the pathogenesis of HBV infection.

METHODS: The mRNA was extracted from HepG2 cells, transfected with pcDNA3.1(-)-complete surface and pcDNA3.1(-) empty vector respectively, to synthesize cDNA. After digested by *RsaI*, the cDNA was divided into two groups and connected to different sites, and then suppression subtractive hybridization (SSH) method and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. The coding gene transactivated by HBV complete surface was cloned by bioinformatics methods. The obtained sequences were searched for homologous DNA sequences from GenBank.

RESULTS: One of the obtained sequences had no homology with known genes in GenBank and its function was

unknown. It could be transactivated by complete surface protein of hepatitis B virus, so it was named complete surface transactivated protein 1 (CSTP1). It was also registered in GenBank with the number AY553877. CSTP1 gene had 945 nucleotides and its coding product was made up of amino acid residues.

CONCLUSION: The human gene transactivated by HBV complete surface is successfully cloned. This result will pave the way for the study of the molecular mechanism of the transactivating effects of HBV complete surface protein.

Bai GQ, Cheng J, Liu Y, Wu SH, Lin SM, Huang YP, Zhang SL. Cloning of human gene 1 transactivated by complete surface protein of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2581-2584

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交(SSH)技术及生物信息学(bioinformatics)技术筛选并克隆乙型肝炎病毒(HBV)全S反式激活新型靶基因, 进一步阐明HBV感染相关疾病的发病机制。

方法: 以HBV全S蛋白表达质粒 pcDNA3.1(-)-全S转染 HepG2 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-)为平行对照, 提取 mRNA 逆转录为 cDNA, 经 *RsaI* 酶切后将实验组 cDNA 分成 2 组, 分别与 2 种不同的接头衔接, 与对照组 cDNA 进行二次杂交和二次 PCR。并结合生物信息学技术, 克隆 HBV 全S反式激活作用的新型靶基因。

结果: 对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段。成功克隆出他的全长序列并测序证实, 其可以被全S蛋白反式激活, 故命名为全S反式激活蛋白1 (CSTP1), 已在GenBank中注册, 注册号: AY553877。CSTP1 基因的编码序列全长为 945 个核苷酸(nt), 编码产物由 315 个氨基酸残基(aa)组成。

结论: HBV 全S蛋白具有反式激活蛋白1基因克隆成功。HBV全S反式激活新靶基因的发现, 为进一步研究HBV全S的分子生物学机制和探索新型治疗技术奠定基础。

白桂芹, 成军, 刘妍, 吴顺华, 蔺淑梅, 黄燕萍, 张树林. 乙型肝炎病毒全S蛋白反式激活蛋白1基因的克隆化. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2581-2584
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2581.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)为带包膜的肝DNA病毒属, HBV基因组中界定了4个开放读码框(ORF), 分别命名为S、C、P、X去, 其中S区又因不同的起始密码子

(ATG)而又人为的分为前-S1、前-S2和S三个区^[1]。董菁 *et al*^[2]应用长距离并且精确 PCR 技术(long and accurate PCR, LA-PCR)研究了乙型肝炎患者血清中存在的 HBV 病毒基因组发现在前-S1 的 ORF 之前存在一融合编码的 ORF, 该区区长 135 bp, 命名为前-前-S 区, 并且证实了在前-前-S 基因上游 277 bp 核苷酸序列有启动子活性^[3], 其功能为调控前-前-S 区与 HBV 大蛋白的融合表达, 并提示前-前-S 区的 HBV 克隆株多来自日本和中国^[4]。抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果^[5-6]。我们利用 SSH 对 HBV 全 S (包括前-前-S 区)蛋白反式激活作用进行研究, 将真核表达载体 pcDNA3.1(-)-HBV 全 S 基因转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 并以转染空白载体的相同细胞系作为对照, 以 2 种转染的细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了 HCV 全 S 蛋白反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库。同时我们结合生物信息学(bioinformatics)技术克隆了全 S 蛋白反式激活的新型靶基因, 即 HBV 全 S 蛋白反式激活蛋白 1 (CSTP1)基因, 从而为 HBV 全 S 蛋白作用的研究提供新的方向。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 DH5 α 为本室保存, pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司; FuGENE6 转染试剂购自 Roche, mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech, PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 \times PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech, High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, T7、SP6 通用引物及 pGEM-T 载体、pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司。HBV 全 S 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-全 S 由本室构建。DNA 序列测定由上海博亚公司完成。

1.2 方法 消减杂交文库的建立及克隆分析: 分别将 pcDNA3.1(-)-全 S 及 pcDNA3.1(-)空载体转染 HepG2 细胞, 48 h 后提取 mRNA, 以此 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA(dscDNA), 并分别标记为 Tester 和 Driver, 经 *Rsa* I (一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化后将 Tester cDNA 分为两份, 分别连接特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 与过量的 Driver cDNA 进行 2 次消减杂交和 2 次抑制性 PCR, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 平铺于含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入

片段后(200-1 000 bp), 测序。根据电子拼接的新基因序列(945 bp), 利用生物信息分析软件 Vector NTI 设计新基因的序列特异性的含有特异性核酸内切酶(*Eco*RI/*Bam*HI)的引物, 利用 HepG2 细胞来源的 mRNA, 经过 RT-PCR 扩增, 并与 pGEM-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 铺于含有氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。挑取阳性菌落, 增菌, 使用碱裂解法提取质粒后进行双酶切(*Eco*RI/*Bam*HI)和菌落 PCR 鉴定, 证明目的基因约 945 bp 后测序, 进一步鉴定正确后获得阳性克隆。

2 结果

纯化高质量的 mRNA 是获得 cDNA 高产量的前提。紫外分光检测显示, 转染了全 S 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.94 μ g 和 4.75 μ g, $A_{260}/A_{280} = 2.09$ 。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实 mRNA 质量足。

2.1 消减杂交文库的构建与分析 dscDNA 两端连接效率检测结果显示两组 dscDNA 已与接头高效率连接。消减效率的鉴定结果显示: 与未消减组 PCR 产物相比, 消减组 PCR 产物中看家基因甘油三磷酸脱氢酶(G3PDH)基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率。对差异表达基因片段进行菌落 PCR 扩增, 结果显示为 200-1 000 bp 大小不等的插入片段。挑选克隆测序并与 GenBank 数据库进行初步比较。

2.2 新基因的序列分析及全长基因的获得 利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN), 发现其中的 1 个克隆序列与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源。电子拼接推定该基因的开放读码框架, 设计引物, 从 HepG2 细胞提取总 RNA 后, 进行 RT-PCR, 扩增出约 945 bp 片段(图 1), 经过测序克隆出全长基因片段, 获得 HBV 全长 S 反式激活作用的新型靶基因, 命名为 CSTP1。新基因的开放读码框架(ORF)长度为 945 nt, 编码产物由 315 aa 组成(图 2)。

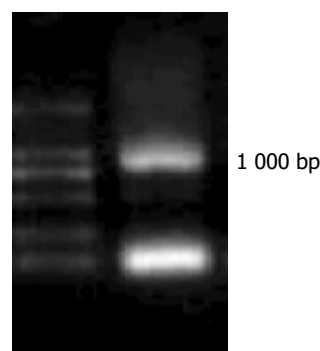


图 1 HBV 全 S 蛋白反式激活靶基因 CSTP1 的 RT-PCR 扩增结果。

ATG TCG GCT GCA GAG GCG GGG GGT GTT TTC
 M S A A E A G G V F
 CAC AGA GCC AGG GGC AGG ACC CTG GAC GCG
 H R A R G R T L D A
 TTT CCC GCA GAA AAG GAA AGC GAA TGG AAA
 F P A E K E S E W K
 GGC CCA TTC TAC TTC ATC CTG GGC GCA GAC
 G P F Y F I L G A D
 CCA CAG TTT GGG CTG ATC AAG GCC TGG TCC
 P Q F G L I K A W S
 ACT GGG GAC TGT GAC AAT GGC GGT GAC GAA
 T G D C D N G G D E
 TGG GAA CAG GAG ATC CGT CTA ACT GAG CAA
 W E Q E I R L T E Q
 GCC GTC CAG GCC ATC AAC AAG CTG AAC CCC
 A V Q A I N K L N P
 AAA CCC AAA TTC TTC GTT CTG TGC GGC GAC
 K P K F F V L C G D
 CTC ATC CAC GCC ATG CCA GGG AAG CCG TGG
 L I H A M P G K P W
 CGG ACG GAG CAG ACG GAG GAC CTG AAG CGA
 R T E Q T E D L K R
 GTG CTT AGG GCA GTG GAC AGG GCC ATC CCA
 V L R A V D R A I P
 CTG GTC CTT GTC AGC GGC AAC CAT GAC ATT
 L V L V S G N H D I
 GGC AAC ACC CCC ACG GCC GAG ACC GTC GAG
 G N T P T A E T V E
 GAG TTC TGC CGG ACT TGG GGA GAT GAC TAC
 E F C R T W G D D Y
 TTC AGC TTC TGG GTC GGG GGC GTC CTG TTC
 F S F W V G G V L F
 CTG GTC CTC AAC TCC CAG TTC TAC GAG AAC
 L V L N S Q F Y E N
 CCC TCC AAA TGC CCC AGC CTG AAG CAG GCT
 P S K C P S L K Q A
 CAG GAC CAG TGG CTG GAC GAG CAG CTG AGC
 Q D Q W L D E Q L S
 ATC GCG AGG CAG CGG CAC TGC CAG CAT GCC
 I A R Q R H C Q H A
 ATC GTC TTC CAG CAC ATC CCG CTG TTC CTG
 I V F Q H I P L F L
 GAG AGC ATC GAC GAG GAC GAC GAC TAC TAC
 E S I D E D D D Y Y
 TTC AAC CTC AGC AAG TCC ACT CGG AAG AAG
 F N L S K S T R K K
 TTG GCA GAC AAG TTC ATC CAC GCA GGT GTC
 L A D K F I H A G V

AGA GTC GTG TTC TCA GGC CAC TAC CAC AGG
 R V V F S G H Y H R
 AAT GCC GGG GGT ACC TAC CAG AAC CTC GAC
 N A G G T Y Q N L D
 ATG GTG GTG TCA TCT GCC ATT GGA TGC CAG
 M V V S S A I G C Q
 CTG GGC AGA GAC CCC CAC GGG CTC CGA GTC
 L G R D P H G L R V
 GTG GTG GTC ACC GCC GAG AAA ATT GTT CAC
 V V V T A E K I V H
 CGA TAC TAC AGT CTA GAT GAG CTG AGT GAG
 R Y Y S L D E L S E
 AAA GGA ATA GAA GAC GAT CTC ATG GAT TTG
 K G I E D D L M D L
 ATC AAG AAA AAA TGA
 I K K K *

图2 HBV 全 S 蛋白反式激活靶基因 CSTP1 的核苷酸序列和蛋白质一级结构序列。

3 讨论

病毒的基因表达调节与真核细胞相似, 主要是转录水平为主的多水平的调节机制, 转录水平的调节根据调节的机制和参与的因素不同, 可以分成顺式(cis)调节和反式(trans)调节 2 种. HBV 基因组编码的蛋白作为反式激活因子, 对肝细胞某些基因表达调控的影响, 可能是 HBV 促进肝细胞恶性化和慢性化的主要因素. 早期研究多集中在整合的病毒 DNA 编码的 HBxAg 蛋白广泛的反式激活活性上^[7-10]. 近年研究发现, 从肝癌细胞系或肝癌组织中亚克隆出的截短型前-S2/S 基因表达产物羧基末端的截短型分子 MHBst 也具有反式激活功能^[11-14].

乙型肝炎病毒感染, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生发展密切相关^[15-16]. HBV 为包膜 DNA 病毒, 他的包膜由 3 个相关的表面蛋白组成, 他们是主蛋白(S), 中蛋白(M, 前-S2+S), 大蛋白(L, 前-S1+前-S2+S). 还有前-前-S 区, 由病毒基因组同一开放读码框编码, 但起始位点不同. 那么, 包括前-前-S 在内的全 S 蛋白的功能如何呢? 我们应用 SSH 研究包括前-前-S 在内的全 S 蛋白的反式激活作用, 发现其反式激活的新基因 CSTP1 并对其进行克隆化研究, 将进一步完善全 S 的生物学功能. 并且, 对 HBV 感染的检测、疫苗设计、HBV 进入肝细胞机制(受体学说)、表面抗原的表达过程及功能、宿主抗感染机制、HCC 产生机制研究产生重大影响.

4 参考文献

- 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 李莉. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002; 27:116-118
- 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S 区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 杨倩, 董菁, 成军. 乙型肝炎基因组中前-前-S 编码基因启动子

- 序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;9:761-762
- 4 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳. 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 5 刘妍, 成军, 王刚. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 6 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较. 世界华人消化杂志 2004;12:327-331
- 7 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 8 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 9 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-322
- 10 成军, 李莉. 新型抗乙肝病病毒药物氟硫胞苷的作用及机制. 世界感染杂志 2002;2:1-4
- 11 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:238-242
- 12 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1 基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 13 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 中华微生物学与免疫学杂志 2002;22:27
- 14 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 15 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 16 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 编辑要点

经《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》编委审稿后, 非常优秀的论文可直接录用, 通知作者按照编委审稿意见及本刊的书写格式进行修改, 符合本刊要求的论文经第一和第二编辑语言处理后方可进行排版. 排版后校样由责任编辑审读全文, 无语法及拼写错误方可付印. WJG 为了确保其出版的每篇论文的编辑质量, 特制定了编辑要点如下.

1 题名

应简明扼要有特色, 突出主题, 不宜过长; 应直入主题, 避免使用“探讨、研究、分析、观察、调查、探索”等词语; 不用定冠词 The, 一般不使用缩写字(常用缩写字例外). 具体写作的要求见《科技论文英文题名的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/26.asp>.

2 摘要

采用结构式摘要. 目的部分应直入主题, 如 To investigate the, 可简要交代背景或该课题目前开展情况; 方法(包括材料)和结果(包括重要数据)部分使用过去时, 结论部分使用一般现在时. 人称和语态使用应自然, 避免使用“悬垂分词”. 摘要的第一句不要重复文章题名, 应增加变化, 补充一些细节. 具体写作要求见《科技论文英文摘要的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/25.asp>.

3 正文

(1) 短句子: 提倡使用短句子, 尽量避免一个句子使用多个从句. 拼写正确, 时态一致、准确. 方法及结果部分一般使用过去时. 讨论部分, 引用文献叙述一般使用过去时, 结论性语言使用一般现在时. 要注意主句和从句的时态呼应及文中上下文含意的呼应; 应尽量对照其中文稿以求如实表达其原意; 使用分词短语作状语和定语时, 一定要注意其语态的正确使用, 以求其前后呼应; 应注意用词的对照一致及词语的固定搭配等; 在编辑过程中, 一定要核对各基本数据及其百分比. 此外, 还应注意标点符号的正确使用与拉丁语名词的单复数. (2) 数字: 出现在句首的数字应写为: Sixteen cases... 或 A total number of 16 cases 而不能写为: 16 cases, 100 patients, 等. (3) 缩略词: 首次使用词语时, 应先写出全称然后在括号内写出其缩写词. (4) 斜体: 细菌、病毒、动植物的拉丁学名、统计学符号、基因符号、内切酶(前 3 个字符)、量符号、拉丁词如 *in vivo*, *in situ*, *et al* 等及参考文献中的刊名应使用斜体. (5) 图表: 不要重复使用, 已用图表示的内容不再使用表格. 表和图题的说明应与正文的文题一样, 文内图表的标注使用句子表示时应使用一般现在时而不使用过去时, 如 The data are shown in Table 1. 图表置正文内, 图表内注解首字母大写, 其余小写.

4 参考文献

应按先后顺序在正文内标出. 参考文献全体作者是否与首页一致, 题名与首页是否一致, 刊名与首页是否一致, 年与首页是否一致, 卷号与首页是否一致, 起页 - 止页与首页是否一致, PMID 号是否与首页一致.

5 其他

(1) 注意字符间空格, 文稿要隔行打印. (2) 使用正式文体, 不用口语体和非规范缩写词. 如 isn't, aren't, hasn't, hadn't, haven't, don't, can't, wouldn't, a lot of, a bit, too (also), thru (through), exam (examination), lab (laboratory) 等. (3) 要客观地叙述方法和结果, 用词要质朴无华, 避免使用带感情色彩或广告式宣传的词语. (4) 可用动词时应尽量避免使用动词的名词形式. (5) 正确使用冠词, 对可数词应尽量使用复数形式. (6) 应多用预置短语分开或用连字符断开名词词组, 避免使用长系列形容词或名词修饰名词. (7) 尽量应用重要的事实开头, 避免短语或从句开头. (8) 涉及他人的工作或研究成果时, 尽量列出其姓名, 两名以上的作者一定要用“*et al*”. 具体写作要求见《科技论文的写作要点》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/31.asp>.

CpG-ODN介导活化的人免疫细胞体外抗乙型肝炎病毒作用

李 宁, 范学工, 陈朝晖, 朱 才, 刘洪波

李宁, 范学工, 陈朝晖, 朱才, 刘洪波, 中南大学湘雅医院感染病科
湖南省长沙市 410008
陈朝晖, 中南大学湘雅医院医学实验中心 湖南省长沙市 410008
李宁, 男, 1970-11-20 生, 湖南省宁乡县, 汉族. 湘雅医院传染病学 2002
级博士, 助研. 主要从事病毒性肝炎发病机制研究.
湖南省科技攻关计划项目资助课题, No. 04SK3040-3
项目负责人: 范学工, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 87 号, 中南大学湘雅
医院感染病科. xgfan@hotmail.com
电话: 0731-4327392 传真: 0731-4327332
收稿日期: 2004-07-16 接受日期: 2004-08-20

Anti-hepatitis B virus effects of human peripheral blood mononuclear cells activated by CpG-ODN

Ning Li, Xue-Gong Fan, Zhao-Hui Chen, Cai Zu, Hong-Bo Liu

Ning Li, Xue-Gong Fan, Cai Zu, Hong-Bo Liu, Department of Infectious
Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008,
Hunan Province, China
Zhao-Hui Chen, Center for Laboratory Medicine, Xiangya Hospital,
Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Supported by the Research Programs of Science and Technology Com-
mission Foundation of Hunan Province, No. 04SK3040-3
Correspondence to: Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases,
Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan
Province, China. xgfan@hotmail.com
Received: 2004-07-16 Accepted: 2004-08-20

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) activated by synthetic oligodeoxynucleotides (ODN) containing unmethylated CpG dinucleotides (CpG-ODN) on hepatitis B virus (HBV) *in vitro*.

METHODS: CpG-ODN was co-cultured with PBMCs. The IFN- α and IFN- γ in the supernatant were measured by ELISA. PBMCs activated by CpG-ODN were added to HBV transfected HepG2.2.15 cells After 1, 2 and 3 days, HBsAg and HBeAg in the supernatant were measured by ELISA; HBV DNA and HBV mRNA in HepG2.2.15 cells were detected by fluorogenic quantitative PCR method. MTT method and enzyme assays were used to detect PBMC-mediated lytic activity against HepG2.2.15 cells.

RESULTS: CpG-ODN induced high amounts of IFN- α as well as IFN- γ production (382.69 ± 136.62 , 37.42 ± 6.55). Though CpG-ODN was unable to inhibit HBV replication directly, PMBC activated by CpG-ODN significantly reduced HBsAg and HBeAg secretion of HepG2.2.15 cells with rates of 82.6% and 52.4% at 72 h respectively ($P < 0.05$). The remarkable inhibitory effects of PMBC activated by CpG-ODN on HBV DNA (21.5%) and HBV mRNA (81.3%) in HepG2.2.15 cells were also observed ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: PMBC activated by CpG-ODN can indirectly inhibit HBV replication and expression *in vitro*.

Li N, Fan XG, Chen ZH, Zu C, Liu HB. Anti-hepatitis B virus effects of human peripheral blood mononuclear cells activated by CpG-ODN. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11):2585-2589

摘要

目的: 探讨CpG-ODN活化的人外周血单个核细胞(PBMC)体外对HBV复制和表达的抑制作用。

方法: CpG-ODN体外刺激PBMC, ELISA测培养液IFN- α 及IFN- γ 的分泌;将CpG-ODN介导活化的PBMC与HepG2.2.15细胞按一定比例共孵育1 d、2 d和3 d后, ELISA检测培养上清液中HBsAg、HBeAg的分泌, 荧光定量PCR检测HepG2.2.15细胞内HBV DNA和HBV mRNA的含量;并以MTT和酶学检测活化的PBMC对HepG2.2.15细胞的杀伤作用。

结果: CpG-ODN有效诱导PBMC分泌IFN- α 和IFN- γ ; CpG-ODN本身虽不能直接抑制HBV的复制, 但由CpG-ODN介导活化的PBMC却能显著减少HepG2.2.15细胞对HBsAg、HBeAg的分泌, 同时对HBV DNA和HBV mRNA的抑制作用亦明显增强; CpG-ODN介导活化的PBMC对HepG2.2.15的杀伤作用增强。

结论: CpG-ODN可通过活化机体免疫细胞, 而具有明显的抗HBV复制和表达作用。

李宁, 范学工, 陈朝晖, 朱才, 刘洪波. CpG-ODN介导活化的人免疫细胞体外抗乙型肝炎病毒作用. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2585-2589
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2585.asp>

0 引言

近年来研究发现, 细菌DNA包含有非甲基化CpG基序组成的免疫刺激序列, 在体内外可发挥免疫刺激效应, 而包含有一个或多个CpG基序的人工合成的寡核苷酸链(CpG-ODN)^[1-2]也具有相似的免疫刺激功能^[3-6]. 已有较多的研究表明, CpG-ODN作为免疫刺激剂, 通过激活免疫系统, 使小鼠获得对多种细菌和病毒, 如幽门螺杆菌^[7]、疟原虫^[8]、利什曼原虫^[9]和2型单纯疱疹病毒(HSV-2)^[10-11]等感染的保护性免疫. 但目前尚没有

CpG-ODN 抗乙型肝炎病毒(HBV)的研究报道. 为此, 我们以能表达HBV多种产物并分泌HBV颗粒的HepG2.2.15细胞^[12-14] (简称2.2.15细胞)为模型^[15-18], 观察了CpG-ODN介导活化的免疫细胞体外抑制HBV作用, 并对其可能的机制进行了初步的探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 淋巴细胞分离液购自上海生化二厂; 2.2.15细胞由本室引进并保存; 人IFN- α 和IFN- γ ELISA试剂盒购自武汉博士德公司; HBsAg, HBeAg定量检测试剂盒购自苏州新波生物技术有限公司; HBV DNA荧光定量PCR试剂盒购自上海申友生物技术有限公司; MTT为Serva公司产品; 新鲜健康人血由本院输血科提供; 时间分辨荧光测定仪为WALLAC公司产品; 荧光定量PCR仪为美国BIORAD公司产品. CpG-ODN(ODN 2216)序列参见文献[19], 对照序列(ODN 2243)是将ODN 2216中的CpG替换成GpC. 两序列均由上海生物工程公司合成, 高效液相色谱(HPLC)纯化, 溶于生理盐水(NS).

1.2 方法 CpG-ODN对外周血单个核细胞(PBMC)的活化. 在无菌条件下取12名健康人外周血, 肝素抗凝, 淋巴细胞分离液常规分离PBMC, 调细胞浓度为 $5 \times 10^6/L$, 接种24孔板, 每孔1 mL. 实验分三组: A组为PBMC; B组为PBMC+ODN 2243; C组为PBMC+ODN 2216. ODN终浓度均为6 mg/L, 细胞置37 $^{\circ}C$, 50 mL/L CO₂条件下培养2 d, 收集上清, 分装并-70 $^{\circ}C$ 保存. 收集PBMC上清液, 按试剂盒说明对IFN- α 及IFN- γ 含量进行ELISA检测.

1.2.1 活化的免疫细胞对2.2.15细胞分泌HBsAg和HBeAg的抑制作用 实验分5组: 2.2.15细胞组; 2.2.15+ODN 2216组; 2.2.15+PBMC组; 2.2.15+PBMC+ODN 2243组; 2.2.15+PBMC+ODN 2216组. 2.2.15细胞以 $1 \times 10^5/$ 孔接种24孔板, 常规培养过夜后, 按1:50比例每孔加入新鲜分离的健康人PBMC 5×10^6 个, 同时分别加入ODN使其终浓度均为6 mg/L. 细胞置37 $^{\circ}C$, 50 mL/L CO₂条件下培养24、48和72 h, 分别收集培养上清及细胞. 不同时间段的各组细胞培养上清HBsAg和HBeAg含量的检测采用双抗体夹心时间分辨免疫荧光分析法(time-resolved immunofluorometric assay)^[20], 具体方法见说明书. HBsAg结果采用 $\mu g/L$ 表示, 浓度值 $\geq 0.2 \mu g/L$ 的样品为阳性, 否则为阴性. HBeAg结果采用NCU/L(national central clinical laboratory unite, NCU)表示, 浓度值 ≥ 30 NCU/L的样品判断为阳性, 否则为阴性. 按下式计算HBV抗原表达的抑制率: 抑制率=(对照孔浓度-实验孔浓度) \div 对照孔浓度 $\times 100\%$.

1.2.2 荧光定量PCR检测 2.2.15细胞内HBV DNA和HBV mRNA 上述5组细胞分别培养24、48和72h后, 提取2.2.15细胞内HBV DNA和HBV RNA, 操作按说明书. 以荧光染料掺入法定量检测2.2.15细胞内HBV DNA和HBV RNA. 细胞内HBV DNA的检测采用直接PCR, 细

胞内HBV mRNA定量参见文献[21]. 先按常规方法将mRNA逆转录成cDNA, 然后取cDNA 2 μL 用于PCR定量扩增, 具体方法见说明书, 最低检测限度为 10^6 拷贝/L. 按下式计算HBV DNA分泌的抑制率: 抑制率=(对照孔拷贝数log值-实验孔拷贝数log值) \div 对照孔拷贝数log值 $\times 100\%$.

1.2.3 CpG-ODN介导活化的免疫细胞对2.2.15细胞的杀伤作用 常规培养2.2.15, 调整细胞密度, 取 5×10^3 细胞/孔加入96孔板. 以新鲜分离的PBMC为效应细胞, 在每孔中加入不同数量的PBMC, 使其与2.2.15细胞比例分别为12.5:1, 25:1, 50:1和100:1, 将每孔总体积定容到200 μL , 同时分别加入ODN使其终浓度为6 mg/L. 实验设3个复孔, 效应细胞对照孔加入100 μL 完全培养基. 细胞于37 $^{\circ}C$, 50 mL/L CO₂培养箱孵育3 d, 加入5 g/L MTT 20 μL 继续培养5 h, 离心培养板(2 000 r/min, 10 min), 弃上清, 每孔加DMSO 150 μL , 于570nm处测定A值. 相同实验均重复3次. 根据以下公式计算各组细胞的杀伤活性: 杀伤活性=[1-(实验孔A均值-效应细胞对照孔A均值) \div 靶细胞对照孔A均值] $\times 100\%$.

1.2.3 酶学检测 取生长期2.2.15细胞, 调整其浓度, 以 5×10^3 细胞/孔加入96孔板, 过夜培养后, 在每孔中加入活化的PBMC, 使其与2.2.15细胞比例为50:1. 实验设3个复孔. 常规培养24、48和72 h后, 离心收集上清, ELISA法检测丙氨酸转氨酶(ALT).

统计学处理 所有资料均采用SPSS7.5统计软件分析, 数据以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示. 两组间比较采用方差检验, $P < 0.05$, 确认为有统计学意义.

2 结果

2.1 CpG-ODN对PBMC的免疫激活作用 正常人PBMC经ODN 2216刺激培养48 h后, 上清IFN- α 及IFN- γ 表达水平较空白对照明显增加, 两组之间有显著性差异, 而对照序列ODN 2243则没有明显激活PBMC的作用(表1).

表1 CpG-ODN诱导IFN- α 及IFN- γ 分泌的作用($n = 12$, mean \pm SD, ng/L)

组别	IFN- α	IFN- γ
A: PBMC	10.12 \pm 3.53	20.12 \pm 5.83
B: PBMC+ODN 2243	20.01 \pm 8.55	22.28 \pm 4.43
C: PBMC+ODN 2216	382.69 \pm 136.62 ^b	37.42 \pm 6.55 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$ vs 其他组.

2.2 CpG-ODN对HBsAg, HBeAg分泌的抑制效果 ODN介导活化的PBMC以50:1的比例与2.2.15细胞共培养24、48和72 h. 结果(表2)显示, ODN 2216本身对2.2.15细胞HBV抗原的分泌无直接抑制作用. 在

表2 活化的 PBMC 对 2.2.15 细胞 HBsAg, HBeAg 分泌的影响($n = 3$, mean \pm SD, μ g/L NCU/L)

HBV 分组	24 h		48 h		72 h	
	浓度	抑制率(%)	浓度	抑制率(%)	浓度	抑制率(%)
HBsAg 2.2.15	4.01 \pm 0.43	0.0	11.82 \pm 1.81	0.0	18.24 \pm 5.29	0.0
2.2.15+ODN 2216	3.65 \pm 0.38	5.2	10.18 \pm 1.92	6.1	15.53 \pm 3.57	7.2
2.2.15+PBMC	2.21 \pm 0.27	37.7	5.37 \pm 0.61	49.5	9.55 \pm 3.26	47.6
2.2.15+PBMC+ODN 2243	2.08 \pm 0.40	42.3	4.21 \pm 0.56	46.7	8.77 \pm 2.01	51.9
2.2.15+PBMC+ODN 2216	1.36 \pm 0.46	57.8	1.62 \pm 0.89	76.4 ^a	6.55 \pm 1.79	82.6 ^a
HBeAg 2.2.15	0.19 \pm 0.03	0	0.32 \pm 0.02	0	0.55 \pm 0.05	0
2.2.15+ODN 2216	0.18 \pm 0.07	3.0	0.33 \pm 0.07	6.1	0.52 \pm 0.08	7.2
2.2.15+PBMC	0.18 \pm 0.04	9.8	0.28 \pm 0.09	12.5	0.49 \pm 0.14	17.6
2.2.15+PBMC+ODN 2243	0.17 \pm 0.05	11.2	0.26 \pm 0.19	18.7	0.48 \pm 0.16	21.9
2.2.15+PBMC+ODN 2216	0.12 \pm 0.01	20.5	0.15 \pm 0.11	47.4 ^a	0.24 \pm 0.11	52.4 ^a

^a $P < 0.05$ vs 同时时间的其他组.

ODN 2216 组, 细胞培养液中的 HBsAg 和 HBeAg 从培养 24 h 后开始下降, 至 72 h, 二者均已降至最低, 而在 PBMC 组和 PBMC+ODN2243 组, 培养液中 HBsAg、HBeAg 随着培养时间的进展, 其抑制率较空白对照组虽有所上升, 但与 ODN 2216 组相比, 后者抑制率上升更为明显, 经统计学分析, 两组之间具有显著性差异($P < 0.05$).

2.3 CpG-ODN 对 2.2.15 细胞 HBV DNA 和 HBV mRNA 的抑制作用 在不同 ODN 的刺激下, PBMC 与 2.2.15 细胞共培养 72 h 后, 不论是 HBV DNA 或 HBV mRNA 水平, ODN 2216 均对其产生抑制作用, 其抑制率明显高于其他组(表 3), 其中以对 mRNA 水平的影响最为明显, 抑制率高达 81.3%. 此外, ODN 2216 本身对 HBV DNA 的分泌无直接抑制作用.

表3 活化的 PBMC 对 HBV DNA 和 HBV mRNA 的抑制效果($n = 6$, mean \pm SD)

分组	HBV DNA		HBV mRNA	
	拷贝数log值	抑制率(%)	拷贝数log值	抑制率(%)
2.2.15	8.34 \pm 0.11	0	7.26 \pm 2.12	0
2.2.15+ODN 2216	8.21 \pm 0.23	2.1	7.14 \pm 1.79	3.2
2.2.15+PBMC	8.06 \pm 0.34	7.5	6.59 \pm 2.07	8.7
2.2.15+PBMC+ODN 2243	7.76 \pm 0.27	7.7	6.45 \pm 1.38	9.2
2.2.15+PBMC+ODN 2216	6.62 \pm 0.12	21.5 ^a	1.32 \pm 0.22	81.3 ^b

^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$ vs 其他组.

2.4 活化的 PBMC 对 2.2.15 细胞的杀伤作用 我们用 ODN 2243 及空白管作为对照, 进行了 3 次实验. 结果显示, ODN 2216 介导的 PBMC 杀伤活性明显强于相应效-靶比的对照组, 随着效-靶比增大, PBMC 的杀伤活性明显提高, 当效靶比为 50 : 1 和 100 : 1 时, ODN 2216 组的杀伤活性明显高于 ODN 2243 组和空白对照组

的杀伤活性($P < 0.05$, 图 1).

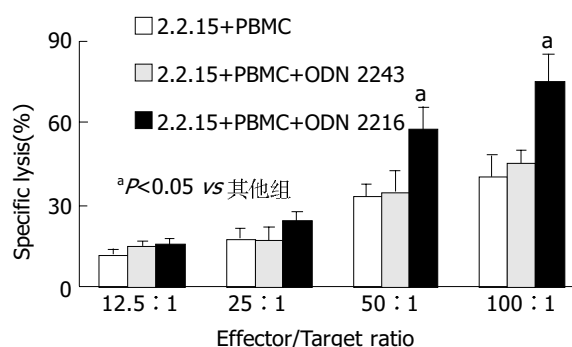


图1 CpG-ODN 激活的 PBMC 对 2.2.15 细胞的杀伤作用.

2.5 酶学结果 2.2.15 细胞与不同 ODN 介导的 PBMC 共同孵育 72 h 后, ODN 2216 组的 ALT 值明显升高, 与其他组相比具有显著性差别($P < 0.05$, 图 2).

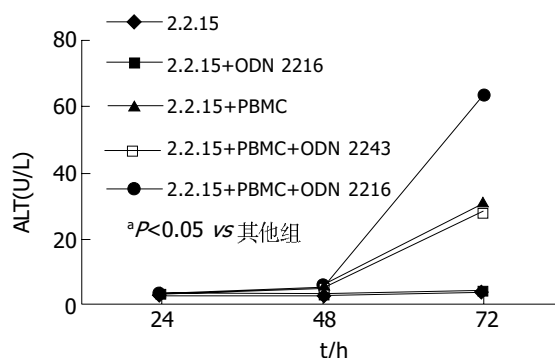


图2 活化的 PBMC 与 2.2.15 细胞孵育后 ALT 的变化情况.

3 讨论

CpG-ODN 参与对多种细胞的激活, 其免疫效应主要取决于 CpG 模体, 将序列的 CpG 甲基化或将 CpG 替换成 GpC 或其他序列, 均将丧失或降低免疫刺激作用. 根据 CpG-ODN 对不同刺激细胞所产生的免疫效应不

同, CpG-ODN 可分为 K 型和 D 型。前者主要促 B 细胞增生并分泌 IgG2 α , IgM 等; 而后者主要活化浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)、单核/巨噬细胞等, 使他们释放高水平的 IFN- α/β , IL-12, IL-18 等细胞因子和高表达 B7, MHC II 分子等^[22-24], 继而诱导活化 NK 细胞分泌 IFN- γ , 引发 Th1 型特征的细胞免疫^[25-27]。我们所采用的 ODN 2216 为典型的 D 型 CpG-ODN, 不仅能激活 PBMC 产生大量的 IFN- α , 同时亦可明显提高 NK 细胞分泌 IFN- γ 能力, 如置换 ODN 2216 中 CpG 模体所获得的 ODN 2243, 则显著降低其产生 IFN- α 及 IFN- γ 的能力, 这提示 CpG-ODN 2216 免疫刺激效应是通过 CpG 模体所介导。Krug *et al*^[28] 认为 CpG-ODN 刺激产生的内源性 IFN 较体外重组的 IFN, 其抗病毒效应更有效、更稳定, 而活化的 DC, NK 等免疫细胞亦可直接或间接参与抗病毒作用。以 Harandi *et al*^[10] 和 Ashkar *et al*^[11] 为首的两个科研小组在研究 CpG-ODN 抗 HSV-2 感染时证实, 感染前 24 h CpG-ODN 局部或全身给药, 能显著激活 DC 和 NK 细胞, 极大的抑制 HSV-2 在小鼠体内的复制, 并保护鼠免遭病毒致死性攻击。鉴于目前尚无 CpG-ODN 介导的抗 HBV 研究, 在获得了能活化 PBMC 的 CpG-ODN 后, 应用 2.2.15 细胞, 我们进一步研究了 CpG-ODN 介导活化的 PBMC 体外对 HBV 复制与表达的抑制作用。结果表明, ODN 2216 虽本身不能直接抑制 HBV 的复制, 但可通过活化 PBMC 而间接抑制 HBsAg, HBeAg 的分泌, 其抑制率均明显大于 ODN 2243 对照组, 其中以对 HBsAg 的抑制最为明显, 最高可达 82.6%; 同时发现(表 2), PBMC 及 ODN 2243 组也表现出一定的抑制 HBV HBsAg, HBeAg 分泌的活性, 但这两组之间并无显著性差异, 并且与 ODN 2216 组相比, 其抑制 HBV 抗原表达的能力均远低于后者, 提示这两组抗病毒效应的产生可能是正常人 PBMC 在自然状态下也具有一定的抗 HBV 能力。

IFN 的抗 HBV 作用主要是通过激活多种抗病毒蛋白而活化内源性 RNA 酶, 因此, IFN 不仅可抑制 HBV DNA 的复制, 还可通过降解 mRNA 来遏制病毒蛋白的翻译^[29]。我们的结果(表 3)表明, CpG-ODN 本身虽不直接作用 HBV DNA 和 HBV mRNA, 但可通过活化 PBMC 对 HBV DNA 和 HBV mRNA 产生较好的抑制作用; 并进一步发现 CpG-ODN 对 HBV mRNA 的抑制作用明显强于 HBV DNA 水平, 推测 IFN 可能参与了抑制 HBV 复制的作用, 但并不排除其他免疫分子的参与。MTT(图 1)和酶学(图 2)结果亦显示, 与其他组相比, CpG-ODN 介导活化的 PBMC 对 2.2.15 细胞有明显的杀伤作用, 提示这可能与 CpG-ODN 激活的免疫细胞有关。目前的研究认为, 某些天然免疫细胞如 NK 细胞、DC 细胞等可通过直接杀伤被感染的细胞或分泌大量的免疫分子而发挥抗病毒效应。CpG-ODN 可能通过活化上述天然免疫细胞而杀伤 2.2.15 细胞, 进而使其胞内的 HBV 复制受到抑制。尽管目前用于治疗慢性乙型肝炎的免疫调节剂众

多, 但疗效并不显著且缺乏针对性。即使目前较多使用的抗 HBV 药如干扰素和核苷类似物, 虽能在一定程度上抑制 HBV 复制, 但因复发率高、副作用大以及难以在体内彻底清除病毒等原因而受到限制。因此继续寻求新的抗 HBV 药物, 仍是当前相关学者密切关注的课题。CpG-ODN 作为一种新的免疫调节剂, 不仅可诱发产生内源性 IFN, 同时还可活化 DC, NK 等免疫细胞直接或间接参与抗 HBV 作用, 因此, 在 HBV 高感染的今天, CpG-ODN 具有很好的临床应用前景。

4 参考文献

- 1 Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 2004;34: 251-262
- 2 Rothenfusser S, Hornung V, Ayyoub M, Britsch S, Towarowski A, Krug A, Sarris A, Lubenow N, Speiser D, Endres S, Hartmann G. CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8+ T-cell responses in vitro. *Blood* 2004;103:2162-2169
- 3 Ishii KJ, Takeshita F, Gursel I, Gursel M, Conover J, Nussenzweig A, Klinman DM. Potential role of phosphatidylinositol 3 kinase, rather than DNA-dependent protein kinase, in CpG DNA-induced immune activation. *J Exp Med* 2002;196:269-274
- 4 Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs. *J Immunol* 2001;166:2372-2377
- 5 Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ. Distinct CpG DNA and polynosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol* 2001;166:2291-2295
- 6 Sester DP, Naik S, Beasley SJ, Hume DA, Stacey KJ. Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J Immunol* 2000;165:4165-4173
- 7 Raghavan S, Nystrom J, Fredriksson M, Holmgren J, Harandi AM. Orally administered CpG oligodeoxynucleotide induces production of CXC and CC chemokines in the gastric mucosa and suppresses bacterial colonization in a mouse model of *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 2003;71:7014-7022
- 8 Gramzinski RA, Doolan DL, Sedegah M, Davis HL, Krieg AM, Hoffman SL. Interleukin-12 and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infect Immun* 2001;69:1643-1649
- 9 Verthelyi D, Gursel M, Kenney RT, Lifson JD, Liu S, Mican J, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides protect normal and SIV-infected macaques from Leishmania infection. *J Immunol* 2003;170:4717-4723
- 10 Harandi AM, Eriksson K, Holmgren J. A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in a mouse model of genital herpes infection. *J Virol* 2003;77:953-962
- 11 Ashkar AA, Bauer S, Mitchell WJ, Vieira J, Roenthal KL. Local delivery of CpG oligodeoxynucleotides induces rapid changes in the genital mucosa and inhibits replication, but not entry, of herpes simplex virus type 2. *J Virol* 2003;77:8948-8956
- 12 袁冬生, 王新华, 李常青, 肖会泉. 复方肝瘤宁抗乙型肝炎病毒的体外实验研究. *世界华人消化杂志* 2004;12:1292-1294
- 13 Liu J, Guo Y, Xue CF, Li YH, Huang YX, Ding J, Gong WD, Zhao Y. Effect of vector-expressed siRNA on HBV replication in hepatoblastoma cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1898-1901
- 14 Song CZ, Wang QW, Song CC, Bai ZL. Viral replication modulated by synthetic peptide derived from hepatitis B virus X protein. *World J Gastroenterol* 2004;10:389-392
- 15 王九平, 白雪帆, 张三奇, 李谨革, 张颖, 张岩, 薛克昌, 顾宜, 王平忠, 骆抗先. 肝靶向十六酸拉咪啉固体脂质纳米粒抗乙肝病毒的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:191-194

- 16 Ding J, Liu J, Xue CF, Gong WD, Li YH, Zhao Y. Anti-HBV effect of TAT-HBV targeted ribonuclease. *World J Gastroenterol* 2003;9:1525-1528
- 17 Liu J, Li YH, Ding J, Gong WD, Xue CF, Zhao Y, Huang YX. Quantifying anti-HBV effect of targeted ribonuclease by real-time fluorescent PCR. *World J Gastroenterol* 2004;10:2883-2885
- 18 曹鸿鹏, 陶佩珍. 拉米夫定等六种药物的体外抗乙型肝炎病毒作用. *中华医学杂志* 2001;81:1004-1007
- 19 Rothenfusser S, Hornung V, Krug A, Towarowski A, Krieg AM, Endres S, Hartmann G. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta. *Eur J Immunol* 2001;31:3525-3534
- 20 罗开忠, 杨旭, 苏先狮, 许允, 李良友. 时间分辨免疫荧光法检测乙型肝炎病毒标志物. *中华肝脏病杂志* 2003;11:569
- 21 吴赤红, 曾争, 王勤环, 于敏. 双靶区反义 RNA 抗乙型肝炎病毒的实验研究. *中华医学杂志* 2001;81:605-608
- 22 Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-760
- 23 Krug A, Rothenfusser S, Selinger S, Bock C, Kerkmann M, Battiany J, Sarris A, Giese T, Speiser D, Endres S, Hartmann G. CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells. *J Immunol* 2003;170:3468-3477
- 24 Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 2004;4:1-10
- 25 Blackwell SE, Krieg AM. CpG-A-induced monocyte IFN-gamma-inducible protein-10 production is regulated by plasmacytoid dendritic cell-derived IFN-alpha. *J Immunol* 2003;170:4061-4068
- 26 Heeg K, Zimmermann S. CpG DNA as a Th1 trigger. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;121:87-97
- 27 Verthelyi D, Klinman DM. Immunoregulatory activity of CpG oligonucleotides in humans and nonhuman primates. *Clin Immunol* 2003;109:64-71
- 28 Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2154-2163
- 29 Robek MD, Boyd BS, Wieland SF, Chisari FV. Signal transduction pathways that inhibit hepatitis B virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1743-1747

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 影响因子

影响因子是国际通行的期刊评价指标之一, 是反映期刊重要性的宏观定量指标. 通常影响因子越大, 期刊的学术影响力和作用也越大. 总被引频次是指期刊自创刊以来所刊登的全部论文在统计当年被引用的总次数, 是一个非常客观实际的评价指标, 可以显示该刊被使用和重视的程度, 以及在科学交流中的作用和地位. 美国科学信息研究所(ISI)出版的期刊引证报告(JCR): 《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》2002 年影响因子为 2.532, 被引频次为 1 535. WJG 2002 年影响因子在国际胃肠病学和肝病学领域的 45 种期刊中排名第 13 位, 在 SCI 收录的所有 5876 种国际科学期刊中排名第 797 位. WJG 2001 年影响因子 1.445, 被引频次为 722; WJG 2000 年影响因子 0.993, 被引频次 327 次. 1998 年以来发表的全文电子版(ASP, PDF) 已与 PubMed 中的文摘进行了链接, 全世界的读者在利用 PubMed 检索时即可免费阅读到 WJG 发表的全文, 使本刊作者发表的论文在全球得到及时广泛的传播, 期刊的影响因子逐年上升, 国际影响逐年扩大.

World Journal of Gastroenterology 国际检索系统收录

ISI 编制出版的《科学引文索引》(Science Citation Index®-Expanded, SCI-E)是一种大型的综合性检索工具, 收录世界上 5876 多种权威科技期刊. 它具有严格的选刊标准, 是国际公认的进行科学统计与科学评价的主要工具, 是衡量期刊质量和论文学术水平的重要依据. 由于 SCI-E 特有的著者与著者、文献与文献之间的引用与被引用关系, 使之成为目前国际上最具权威性的科研成果评价体系. 一个国家或地区的科技期刊和论文被 SCI-E 收录和引用的多少, 被认为是评价该国或该地区科学研究水平高低的标志之一. 1998 年以来《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》先后被美国《科学引文索引》(SCI-E, Research Alert®, Current Contents/Clinical Medicine®, Journal Citation Reports®, Clinical Medicine Citation Index®), 美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE), 美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA), 荷兰《医学文摘库 / 医学文摘》(EMBASE/Excerpta Medica, EM), 俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journals, AJ) 收录.

应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选HCVp7蛋白的反式调节基因

郭江, 成军, 纪冬, 赵龙凤, 王建军, 刘妍, 黄燕萍

郭江, 成军, 纪冬, 王建军, 刘妍, 黄燕萍, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心 北京市 100039
赵龙凤, 山西医科大学第一附属医院感染病科 山西省太原市 030001
郭江, 男, 1976-06-13 生, 山西省壶关县人, 汉族, 2002 年山西医科大学传染病学硕士生, 主要从事传染病的临床工作和病毒性肝炎的实验研究。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队九五科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十五科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

Screening and cloning of target genes transactivated by hepatitis C virus p7 protein

Jiang Guo, Jun Cheng, Dong Ji, Long-Feng Zhao, Jian-Jun Wang, Yan Liu, Yan-Ping Huang

Jiang Guo, Jun Cheng, Dong Ji, Jian-Jun Wang, Yan Liu, Yan-Ping Huang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Long-Feng Zhao, Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of Chinese PLA, No. 98H038
Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, 100 Contral Xisihuan Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2004-05-28 Accepted: 2004-09-30

Abstract

AIM: To clone and identify human genes transactivated by hepatitis C virus p7 (HCVp7) protein.

METHODS: Suppression subtractive hybridization (SSH) and bioinformatic techniques were used for screening and cloning of the target genes transactivated by HCVp7 protein. The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-p7 and pcDNA3.1(-) empty vector respectively, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. After digestion with restriction enzyme *Rsa* I, cDNAs of small size were obtained. Then tester cDNA was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and 2 respectively. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent nested PCR twice, and then the product was subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the

library was carried out after transfected with *E. coli* strain DH5 α . The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after PCR.

RESULTS: The subtractive library of genes transactivated by HCVp7 was constructed successfully. The amplified library contained 71 positive clones. Colony PCR showed that 56 clones contained 200-1 000 bp inserts. Sequence analysis was performed in 33 clones randomly, and the full-length sequences were obtained with bioinformatics method. Altogether 15 coding sequences were obtained, including 14 known and 1 unknown.

CONCLUSION: The obtained sequences may be target genes transactivated by HCV p7, and some genes coding proteins get involved in cell cycle regulation, metabolism, and cell apoptosis.

Guo J, Cheng J, Ji D, Zhao LF, Wang JJ, Liu Y, Huang YP. Screening and cloning of target genes transactivated by hepatitis C virus p7 protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2590-2593

摘要

目的: 构建丙型肝炎病毒HCV p7蛋白反式激活相关基因差异表达的差异cDNA, 克隆HCV p7蛋白反式激活相关基因。

方法: 以HCV p7表达质粒pcDNA3.1(-)-p7转染HepG2细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-)为对照; 制备转染后的细胞裂解液, 从中提取mRNA并合成cDNA, 经*Rsa* I酶切后将实验组cDNA分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组cDNA进行两次消减杂交及两次抑制性PCR, 将产物与T/A载体连接, 构建cDNA消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆PCR后进行测序及同源性分析。

结果: 成功构建人HCV p7蛋白反式激活相关基因差异表达的cDNA。扩增后得到56个200-1 000 bp插入片段的克隆, 随机挑选其中33个插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序列, 结果共获得15种编码基因, 其中1个为未知功能的新基因。

结论: 筛选到的cDNA全长序列, 包括与细胞生长调节、物质代谢、和细胞凋亡密切相关的一些蛋白编码基因。

郭江, 成军, 纪冬, 赵龙凤, 王建军, 刘妍, 黄燕萍. 应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选 HCVp7 蛋白的反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(11): 2590-2593

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2590.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是世界范围内慢性肝炎的主要病原之一^[1-2], 约有 1.7 亿人被感染, 常导致严重肝病, 包括肝硬化和肝细胞癌(HCC)^[3-5]. HCV 的基因组含有一个长的开放阅读框架(ORF), 编码一个约 3 010 个氨基酸残基(aa)组成的多蛋白, 该多蛋白被细胞和病毒蛋白酶切割产生至少 10 个病毒基因产物: core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B 蛋白等^[6-8]. p7 是由 HCV 基因组 2580–2768 核苷酸(nt)之间的基因编码的由 63 个氨基酸残基(aa)组成的小蛋白. 关于其功能研究较少. 我们利用抑制性消减杂交技术构建 p7 作用于肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞的反式调节 cDNA 消减文库, 筛选差异表达的基因片段, 并应用生物信息学进行分析, 为加深了解 p7 的功能, 进一步探讨 HCV 发病及致癌机制提供新的研究方向.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 DH5 α 为本室保存, pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司; FuGENE6 转染试剂购自 Roche 公司, mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司, PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒、50 \times PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech 公司, High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司. HCV p7 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-p7 由本室构建. 用 FuGENE6 转染试剂将 2 μ g pcDNA3.1(-)-p7 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞. 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2 方法 消减杂交文库的建立采用 Clontech 公司的 PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 常规 SSH 方法按说明书进行. 以转染了重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA(dscDNA), 并分别标记为 Tester 和 Driver, dscDNA 经 *Rsa* I (一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将 Tester 的 dscDNA 分为两份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 然后与过量的 Driver dscDNA 进行杂交; 合并两种杂交产物后再与 Driver dscDNA 作第 2 次杂交; 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 Tester dscDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增. 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h. 共得到 71 个白色菌落, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明 56 含有插入片段后(200–1 000 bp), 随机挑选其中个 33

个克隆增菌, 测序(上海申友公司), 并且应用生物信息学将测得序列 GenBank 数据库进行同源性分析.

2 结果

紫外分光检测显示, 转染了真核表达质粒及空载体的 HepG2 细胞提取 mRNA 分别为 1.58 μ g 和 2.24 μ g, $A_{260}/A_{280}=2.18.20$ g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实 mRNA 质量完全满足进行消减杂交的要求.

2.1 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 以消减及未消减 PCR 产物为模板, 用 G3PDH 引物进行 PCR 扩增, 分别在 18、23、28、33 次循环结束时从体系中吸取 5 μ L 进行电泳鉴定. 结果显示: 与未消减组 PCR 产物相比, 消减组 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 1).

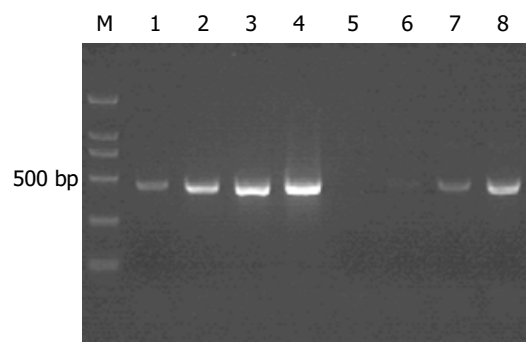


图 1 消减效率分析. 1–4: 未消减组; 5–8: 消减组; 引物分别为 G3PDH3' 5' PCR 循环为 18, 23, 28, 33 次.

2.2 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮 PCR 扩增后, 菌落 PCR 扩增结果显示为 200–1 000 bp 大小不等的插入片段, 所获得的 71 个克隆中 56 含有插入片段, 这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 2).

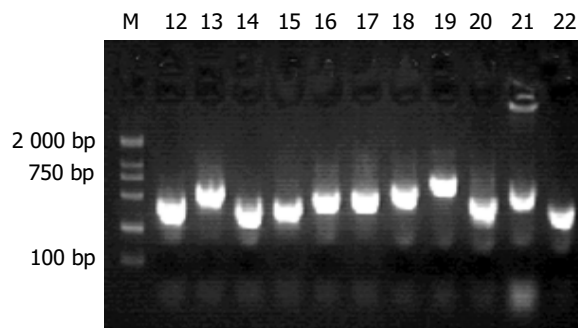


图 2 部分克隆 HCVp7 菌落 PCR 鉴定电泳图.

2.3 cDNA 测序与同源性分析结果 挑选 33 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 其中 32 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(95–100%)1 个克隆未检索到任何相应的相似序列, 代表了新基因, 命名为 HCV p7TP1, GeneBank 注册号为 AY596776(表 1).

表1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

同源蛋白名称	同源克隆数	同源性(%)
核糖体蛋白	5	98-100
SMT3H2 蛋白	6	95-100
乌洛托品结合蛋白(FBP3)	3	97-98
真核翻译起始因子(eIF2A)	2	97-98
线粒体单倍体	3	98-99
二氢二醇脱氢酶	3	100
MSH5 蛋白	3	99
RNA 多聚酶 II, TATA	1	95
盒结合蛋白相关因子(TAF6)		
内质网硫氧还蛋白(TLP19)	1	96
环指蛋白	1	100
唾液酸糖蛋白受体 I(ASGP-R)	1	100
RAD21 蛋白	1	98
T 细胞白血病病毒 I 型结合蛋白 1(TAX1BP1)	1	100
芳香族受体(HOR)	1	98
新基因序列	1	
克隆总计	33	

3 讨论

HCV p7 是一个小的疏水性多蛋白, 编码基因位于结构蛋白和非结构蛋白之间. p7 可在黑脂质膜中形成六聚体阳离子通道, 推测其功能与病毒离子孔道蛋白(viroporin)类似, 可使细胞内膜结构不稳定化, 以利于成熟的病毒颗粒释放^[9-10], 这一离子通道可被金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物抑制^[11-13]. p7 对病毒复制并不是关键的, 但对感染性病毒的产生是必不可少的^[14]. p7 仍有许多功能没有研究清楚, 对其反式激活作用的研究更少. 为进一步研究 p7 的功能, 明确 p7 在丙型肝炎发病机制中的作用, 利用抑制性消减杂交技术^[15-17](suppression subtractive hybridization, SSH)筛选并克隆 HCV p7 反式激活的靶基因, 推测其在体内可能存在功能的线索. SSH方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统的方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果^[18-21]. 我们将真核表达载体 pcDNA3.1(-)-p7, 转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 并以转染空白载体的相同细胞系作为对照, 以 2 种转染的细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了 p7 反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 挑选 33 个克隆测序分析, 主要包括两种类型的序列, 即已知功能的基因序列和未知功能的基因序列. 在本次实验中获得 1 个差异表达的未知序列, 对其基因结构和功能正在研究之中.

在已知功能基因序列中, 主要包括: (1)细胞内结构与细胞生长相关蛋白, 如核糖体 L7 蛋白、真核翻译

起始因子 2A(eIF2A)、环指蛋白 7、MSH5, 还有线粒体蛋白等. (2)参与细胞内代谢的蛋白基因, 如 TLP19、二氢二醇脱氢酶可代谢肝脏的多环芳香烃(DDH), DDH1/2 的表达上升与肝癌的大小和疾病进展的相关^[22-24]. (3)参与细胞内信号转导的蛋白基因, 如 SMT3H2、FBP3、Rad21 和 TAX1BP1. p7 上调 TAX1BP 基因的表达可能是 HCV 致癌的机制之一. (4)其他蛋白, 如唾液酸糖蛋白受体(ASGP-R)等.

通过对 HCV p7 的上述反式激活基因的分析, 我们发现他与体内物质代谢、信号转导、凋亡关系密切^[25-26], 在病毒感染后肝细胞恶性变方面有一定的作用, 而且对于 HCV 病毒颗粒结合和进入肝细胞是重要的. 关于 HCV p7 在体内与各种活性因子的具体调节机制, 仍需进行详细的实验来研究. HCV p7 抑制性消减文库的建立为研究其功能提供了理论依据, 并为 HCV 致癌机制提供了新的研究方向.

4 参考文献

- 1 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 2 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 3 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 4 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 基因表达谱芯片筛选 NS5A TP3 转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12:306-310
- 5 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 6 Wietzke-Braun P, Braun F, Sattler B, Ramadori G, Ringe B. Initial steroid-free immuno suppression after liver transplantation in recipients with hepatitis c virus related cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:2213-2217
- 7 Gong GZ, Jiang YF, He Y, Lai LY, Zhu YH, Su XS. HCV NS5A abrogates p53 protein function by interfering with p53-DNA binding. *World J Gastroenterol* 2004;10:2223-2227
- 8 Anand BS, Velez M. Assessment of correlation between serum titers of hepatitis c virus and severity of liver disease. *World J Gastroenterol* 2004;10:2409-2411
- 9 Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003;535:34-38
- 10 Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain minosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6104-6108
- 11 Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002;76:5326-5338
- 12 Griffin SD, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, Harris M, Rowlands DJ. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for mantadine-sensitive ion hannel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 2004;85:451-461
- 13 Branza-Nichita N, Durantel D, Carrouee-Durantel S, Dwek RA, Zitzmann N. Antiviral effect of N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers. *J Virol* 2001;75:3527-3536

- 14 Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:11646-11651
- 15 Dong XY, Pang XW, Yu ST, Su YR, Wang HC, Yin YH, Wang YD, Chen WF. Identification of genes differentially expressed in human hepatocellular carcinoma by a modified suppression subtractive hybridization method. *Int J Cancer* 2004;112:239-248
- 16 Galbraith EA, Antonopoulos DA, White BA. Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. *Environ Microbiol* 2004;6:928-937
- 17 Hou L, Tang JW, Cui XN, Wang B, Song B, Sun L. Construction and selection of subtracted cDNA library of mouse hepatocarcinoma cell lines with different lymphatic metastasis potential. *World J Gastroenterol* 2004;10:2318-2322
- 18 Sun W, Zhang K, Zhang X, Lei W, Xiao T, Ma J, Guo S, Shao S, Zhang H, Liu Y, Yuan J, Hu Z, Ma Y, Feng X, Hu S, Zhou J, Cheng S, Gao Y. Identification of differentially expressed genes in human lung squamous cell carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Cancer Lett* 2004;212:83-93
- 19 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:456-458
- 20 Ji W, Wright MB, Cai L, Flament A, Lindpaintner K. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics* 2002;3:12
- 21 王方, 王宇明. 抑制性消减杂交技术及其在感染病学中的应用. *世界华人消化杂志* 2004;12:972-975
- 22 Tang DW, Chang KW, Chi CW, Liu TY. Hydroxychavicol modulates benzo[a]pyrene-induced genotoxicity through induction of dihydrodiol dehydrogenase. *Toxicol Lett* 2004; 152:235-243
- 23 Ozeki T, Takahashi Y, Nakayama K, Funayama M, Nagashima K, Kodama T, Kamataki T. Hepatocyte nuclear factor-4 alpha/gamma and hepatocyte nuclear factor-1 alpha as causal factors of interindividual difference in the expression of human dihydrodiol dehydrogenase 4 mRNA in human livers. *Pharmacogenetics* 2003;13:49-53
- 24 Chen CY, Hsu CP, Hsu NY, Shih CS, Lin TY, Chow KC. Expression of dihydrodiol dehydrogenase in the resected stage I non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2002;9:515-519
- 25 Pati D, Zhang N, Plon SE. Linking sister chromatid cohesion and apoptosis: role of Rad21. *Mol Cell Biol* 2002;22:8267-8277
- 26 Saunier B, Triyatni M, Ulianich L, Maruvada P, Yen P, Kohn LD. Role of the sialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol* 2003;77:546-659

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高, 质量较高的论文逐年增加, 来自名牌大学、研究院所, 特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》共收到论文 618 篇, 其中国内论文 501 篇(81.06%), 国际论文 117 篇(18.93%). WJG 2003 年 1-10 期共发表论文 521 篇, 其中文献综述 21 篇, 食管癌 27 篇, 胃癌 54 篇, 肝癌 65 篇, 大肠癌 39 篇, 病毒性肝炎 46 篇, 幽门螺杆菌 20 篇, 基础研究 115 篇, 临床研究 62 篇, 研究快报 62 篇, 病例报告 8 篇, 读者来信 2 篇. 发表国内论文 450 篇(86.37%), 发表国际论文 71 篇(13.62%). 作者共 2949 人, 国际作者占 14.41%, 国内作者占 85.90%. 发表论文分布 34 个国家和地区, 包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文 292 篇(56.04%), 各项目基金论文共 440 篇(84.45%), 其中国际基金论文 25 篇(4.79%), 国家 973、863、国家自然科学基金资助论文 180 篇(34.54%), 部、省级基金资助论文 235 篇(45.10%). WJG 2002 年共发表论文 226 篇, 分布为 26 个地区, 国内论文占 93.36%, 国际论文占 6.63%, 基金论文占 60.61%. WJG 2001 年共发表论文 173 篇, 分布 20 个地区, 112 个机构, 国际论文占 35%, 基金论文占 55%. WJG 2000 年共发表论文 205 篇, 基金论文占 50%. WJG 1999 年共发表论文 144 篇, 分布 20 个地区, 100 个机构, 国际论文占 23%, 基金论文占 50%. WJG 1998 年共发表论文 183 篇, 11 个地区分布, 国际论文占 9.84%, 基金论文占 59.56%.

World Journal of Gastroenterology 点击和下载次数

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》从 2003 年第 4-9 期电子版, 实现了动态网页制做, 记录每篇论文的点击和下载次数. 4-9 期共发表论文 322 篇, 其中 265 篇有点击和下载次数的记录, 占 82.29%, 无点击和下载次数记录的为 57 篇(17.70%). 2003-04-15/2003-10-13, 265 篇论文的点击次数为 35745, 平均每篇论文点击次数为 134.89, 最高点击次数为 1 918, 最低点击次数为 11. 其中每篇论文点击次数 100 次以上为 131 篇(49.43%); 30-99 次为 123 篇(46.41%); 11-29 次为 11 篇(4.15%). 最高下载次数 1 087, 最低下载次数 10. 例如, 2003 年第 8 期刊出的第四军医大学唐都医院感染科王全楚等撰写的“RNA interference: Antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9(8):1657-1661”一文的点击次数为 1 918, 下载次数为 1 087.

幽门螺杆菌和非甾体消炎药对胃上皮细胞动力学的影响

骆智琴, 吴叔明, 萧树东, 童菊芳, 罗鸿予, 沈冠凤

骆智琴, 上海市南汇区周浦医院内科 上海市 201318
吴叔明, 萧树东, 童菊芳, 罗鸿予, 沈冠凤, 上海市消化疾病研究所, 上海第二医科大学附属仁济医院消化内科 上海市 200001
骆智琴, 女, 1973-10-07 生, 江西南昌市人, 汉族, 1996 年江西医学院本科毕业, 2002 年上海第二医科大学硕士研究生毕业, 现在上海南汇区周浦医院内科主治医师。
项目负责人: 骆智琴, 201318, 上海市南汇区周浦医院内科。
收稿日期: 2004-04-04 接受日期: 2004-06-07

Effects of *Helicobacter pylori* and NSAIDs on cytokinetics of gastric epithelium

Zhi-Qin Luo, Shu-Ming Wu, Shu-Dong Xiao, Ju-Fang Tong, Hong-Yu Luo, Guan-Feng Shen

Zhi-Qin Luo, Department of Internal Medicine, Zhoupu Hospital, Nanhui District, Shanghai 201318, China
Shu-Ming Wu, Shu-Dong Xiao, Ju-Fang Tong, Hong-Yu Luo, Guan-Feng Shen, Shanghai Institute of Digestive System Diseases, Department of Gastroenterology, Affiliated Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China
Correspondence to: Dr. Zhi-Qin Luo, Department of Internal Medicine, Zhoupu Hospital, Nanhui District, Shanghai 201318, China.
Received: 2004-04-04 Accepted: 2004-06-07

Abstract

AIM: To investigate the effects of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) and (NSAID) indomethacin and aspirin on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells

METHODS: Gastric cancer cell line AGS cells were co-cultured with *H pylori* and/or NSAID, and then proliferation of AGS was examined by MTT assay, Western blotting and detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). At the same time, cell apoptosis was detected with the FITC-Annexin-V/PI double staining, DNA gel electrophoresis and transmission electron microscopy were used to confirm the results.

RESULTS: The CagA-positive *H pylori* strain NCTC11637 could enhance cell proliferation. Besides, low concentrations (range from 3.2×10^7 CFU/L to 4×10^9 CFU/L) of *H pylori* could promote proliferation ($P < 0.05$) of AGS cell line while high concentrations ($> 2 \times 10^{10}$ CFU/L) could inhibit the growth of AGS cells ($P < 0.05$). When incubated with *H pylori* and NSAID together, proliferation of AGS cells was inhibited. Indomethacin and aspirin increased apoptosis of AGS cells significantly ($P < 0.05$). No obvious apoptosis was observed in the *H pylori*-infected cells. When cells were co-cultured with *H pylori* and NSAID, the percentage of apoptosis also increased significantly ($P < 0.05$), but the percentage was lower than that of cells incubated with NSAID alone. These results were confirmed by transmission electron microscopy and DNA gel electrophoresis.

CONCLUSION: CagA(+) *H pylori* strains are more prone to enhance the proliferation of gastric epithelial cells than cagA(-) *H pylori* strains. The effects of *H pylori* on the cell growth are associated with the concentrations of *H pylori*. NSAID can inhibit the gastric epithelial cell proliferation.

Luo ZQ, Wu SM, Xiao SD, Tong JF, Luo HY, Shen GF. Effects of *Helicobacter pylori* and NSAIDs on cytokinetics of gastric epithelium. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11):2594-2598

摘要

目的: 观察幽门螺杆菌(*H pylori*)和非甾体消炎药(NSAID)对胃上皮细胞增生凋亡的影响。

方法: 胃癌细胞株 AGS 与 *H pylori* 和/或消炎药, 阿司匹林体外共培养, 通过 MTT 比色法, 增生细胞核抗原(PCNA)的 Western Blotting 检测技术, 观察细胞增生情况, FITC-Annexin-V/PI 双染色流式细胞仪检测, DNA 凝胶电泳, 透射电镜方法等检测细胞凋亡。

结果: MTT 比色法和蛋白质印迹检测细胞 PCNA 表达结果表明细胞毒素相关基因 A(CagA)阳性的 *H pylori* 菌株 NCTC11637 能够促进细胞增生, 此外, 低密度($3.2 \times 10^7 - 4 \times 10^9$ CFU/L) NCTC11637 能促进细胞的增生, 而高浓度($> 2 \times 10^{10}$ CFU/L)则抑制细胞的增生。消炎药和阿司匹林能抑制细胞的活力。当 AGS 细胞与 *H pylori* 和 NSAID 共同孵育时, 细胞的生长亦明显受到抑制。FITC-Annexin-V/PI 双染色流式细胞仪检测表明消炎药和阿司匹林可诱导细胞凋亡明显增强, 而 *H pylori* 组则未见凋亡的增强, 当二者共同作用于 AGS 细胞时, 细胞凋亡率明显升高, 但与非甾体消炎药单独作用组相比, 则有所下降。透射电镜和 DNA 琼脂糖凝胶电泳进一步证实了 FITC-Annexin-V/PI 双染色流式细胞仪检测的结果。

结论: CagA 阳性的 *H pylori* 更加容易促进胃上皮细胞的增生。*H pylori* 对细胞生长的影响与 *H pylori* 的密度有关。*H pylori* 和 NSAID 间的作用是相互拮抗的。

骆智琴, 吴叔明, 萧树东, 童菊芳, 罗鸿予, 沈冠凤。幽门螺杆菌和非甾体消炎药对胃上皮细胞动力学的影响。世界华人消化杂志 2004;12(11): 2594-2598

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2594.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)和非甾体消炎药(NSAID)是人类胃

十二指肠疾病的两个比较主要的原因. 二者单独对胃黏膜细胞生长的影响的报道很多, 但具体机制仍不甚明确. 关于二者共存时对胃黏膜细胞的影响的相互作用, 临床研究结果存在争议和矛盾, 相关的体外研究未见报道. 我们从体外研究的角度观察二者单独及共存时对胃黏膜上皮细胞动力学的影响, 明确二者之间的相互作用, 并为二者共存时的相关治疗问题提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 AGS 细胞购自中科院上海细胞生物研究所, *H. pylori* 国际标准菌株 NCTC11637 和 NCTC12908 由上海市消化疾病研究所细菌室提供, 消炎痛和阿司匹林购自 SIGMA 公司. 鼠抗人 PCNA 抗体购自丹麦 DAKO 公司, 过氧化物酶标记羊抗鼠二抗为 CALBIOCHEM 公司产品, FITC-Annexin-V/PI 检测凋亡试剂盒为北京宝赛生物技术有限公司, DNA 抽提试剂盒为 QIAGEN 公司产品. 流式细胞仪为 COULTER EPICS-XL. 人胃癌细胞系 AGS 的培养基为含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液, 置于含 50 mL/L CO₂ 的 37 °C CO₂ 培养箱中培养, 每 3 d 传代 1 次. *H. pylori* 活菌接种于含 70 mL/L 马血的 Skirrow 平板上, 置于 37 °C 微需氧环境中 (50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 850 mL/L N₂) 培养, 2 d 后收集细菌, 用 PBS 制成细菌悬液, 在分光光度计上确定 *H. pylori* 的浓度 ($A_{660}=1 \times 10^{11}$ CFU/L), 然后将 *H. pylori* 菌液作连续 5 倍稀释, 最终菌液浓度为 3.2×10^7 – 2×10^{10} CFU/L).

1.2 方法

1.2.1 MTT 比色实验 细胞以 5×10^7 /L 密度, 100 μ L/孔接种于 96 孔培养板中. 48 h 后加入干预, 每组设 5 个复孔, 置于 37 °C 微需氧环境中 (50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 850 mL/L N₂) 培养. 干预 48 h 后终止培养, 每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μ L, 置于 37 °C 继续培养 4 h 后, 弃去培养上清液, 加入 DMSO, 100 μ L/孔, 充分振荡 20 min. 选择 570 nm 和 630 nm 两个波长, 在酶标仪上测定各孔吸光度值 (*A*) 并记录结果.

1.2.2 增生细胞核抗原 (PCNA) 的蛋白质印迹 (Western Blot) 检测 加入干预 48 h 后, 终止培养, 按照《分子生物学实验技术》中所述提取细胞蛋白后进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后, 取出凝胶, 其中一块用于考马斯亮蓝染色, 另一块用于转膜. 转膜结束后, 在封闭液中 4 °C 过夜封闭. 与鼠抗人 PCNA (1:1 000) 室温下孵育 2 h. TTBS 震荡洗膜 3 次, 与过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h. TTBS 震荡洗膜 3 次, 室温下 DAB 显色, 显色后用蒸馏水洗涤. 观察并照相.

1.2.3 FITC-Annexin-v/PI 双染色流式细胞仪检测凋亡 干预 48 h 后, 终止培养, 收集细胞 (连同悬浮细胞), 用 PBS 漂洗一遍后, 加入试剂盒中的 binding buffer 200 μ L, FITC-Annexin 10 μ L, PI 5 μ L, 避光室温下孵育 15–30 min, 加入 binding buffer 300 μ L, 上流式细胞仪检

测凋亡细胞率.

1.2.4 透射电子显微镜观察 于 4 °C 离心收集各组细胞, PBS 洗两次. 将细胞悬浮于 250 g/L 的戊二醛中, 固定 30 min 后, PBS 洗两次. 细胞悬浮于 10 g/L 锇酸中, 固定 1 h. 以丙酮梯度脱水. 将细胞置于丙酮: 包埋剂 (1:1) 中置换 30 min. 用包埋剂纯浸 2 h. 按常规将细胞包埋, 切片. 在透射电子显微镜上观察, 照相并记录实验结果.

1.2.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳 用胰蛋白酶消化收集细胞, PBS 漂洗一遍, 按照 QIAGEN 公司 Blood and cell culture DNA mini kit 中抽提 DNA 的方法, 得到 DNA 样品, 用紫外分光光度计测定 DNA 含量, 15 g/L 琼脂糖 80 V 电泳 1 h, 溴乙锭染色, DNA 条带在紫外灯下观察摄影.

统计学处理 数据以 mean \pm SD 表示, 采用 SAS 软件统计, 组间比较采用方差分析.

2 结果

2.1 *H. pylori* 和 NSAIDs 对 AGS 胃癌细胞系生长活力的影响 CagA 阳性的 NCTC11637 对 AGS 细胞生长活力的影响: 在 3.2×10^7 – 4×10^9 CFU/L 菌液密度之间, *A* 值明显升高 ($P < 0.05$), 当密度达到 2×10^{10} CFU/L 以上时, *A* 值明显降低 ($P < 0.05$) (图 1). CagA 阴性的 NCTC12908 对 AGS 细胞生长活力的影响: 在 3.2×10^7 – 8×10^8 CFU/L 菌液密度之间, NCTC12908 *H. pylori* 株对 AGS 细胞活力无明显影响 ($P > 0.05$), 当浓度达到 4×10^9 CFU/L 以上时, *A* 值明显降低 ($P < 0.05$, 图 2). NSAIDs 对 AGS 细胞生长活力的影响. 消炎痛 (indimethacin, Ind200–800 μ mol/L) 和阿司匹林 (aspirin, Asp2.5–10 mmol/L) 均抑制细胞的生长, *A* 值明显低于正常对照组 ($P < 0.05$) 并呈浓度依赖性 (图 3, 4). *H. pylori* 和 NSAIDs 对 AGS 细胞生长活力的联合作用: 我们选择对 AGS 细胞增生起促进作用的 8×10^8 CFU/L 密度的 CagA 阳性菌液作为本实验的增生对照组, 而未加干预组则为正常对照组. 与正常对照组相比, 细菌密度为 8×10^8 CFU/L 的 NCTC11637 菌株与不同浓度的 Ind (200, 400, 800 μ mol/L) 或 Asp (2.5, 5, 10 mmol/L) 联合作用于 AGS 细胞时, 呈现抑制细胞生长活力的作用, *A* 值明显下降, $P < 0.05$ (图 3, 4). 与 *H. pylori* 单独作用组相比, 联合作用组的 *A* 也明显下降, $P < 0.05$.

2.2 *H. pylori* 和 NSAIDs 对 AGS 细胞 PCNA 表达的影响 (8×10^8 CFU/L) NCTC11637 *H. pylori* 阳性对照组细胞的 PCNA 蛋白表达水平明显高于正常对照组, 而在 NSAIDs 作用下, 细胞的 PCNA 蛋白表达明显减弱, 在 *H. pylori* + NSAIDs 联合作用组, 细胞 PCNA 的表达亦明显下降 (图 5).

2.3 Annexin-V/PI 双染色流式细胞仪检测凋亡结果 正常对照 ($2.2 \pm 0.6\%$; $1.1 \pm 0.4\%$) 和 *H. pylori* 单独作用组 ($2.0 \pm 0.6\%$; $1.6 \pm 1.2\%$) 的凋亡率都很低, 而消炎痛和阿司匹林诱导细胞凋亡明显增强 ($36.5 \pm 9.0\%$, $14.0 \pm 0.8\%$),

当NSAID和 *H. pylori* 共同作用于 AGS 细胞时, 也可见凋亡率的增高($28.6 \pm 5.7\%$, $6.6 \pm 0.6\%$), 但与NSAID单独作用组相比则有所下降。

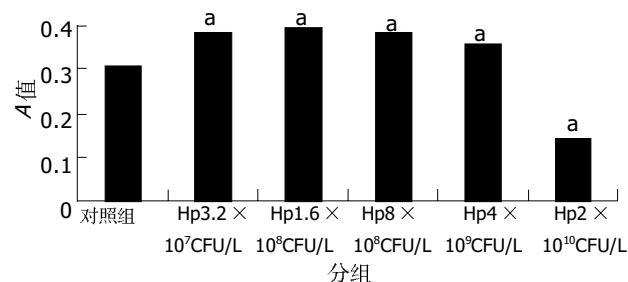


图1 CagA 阳性的 NCTC11637 对 AGS 细胞生长活力的影响. ($^aP < 0.05$ vs 对照组).

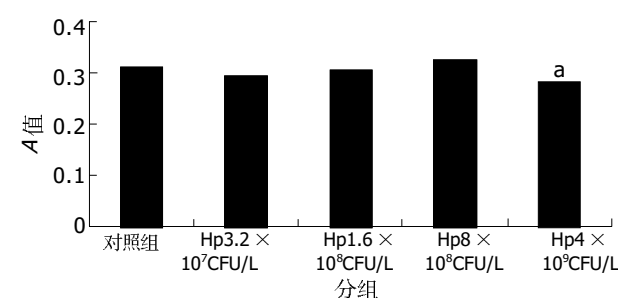


图2 CagA 阴性的 NCTC12908 对 AGS 细胞生长活力的影响. ($^aP < 0.05$ vs 对照组).

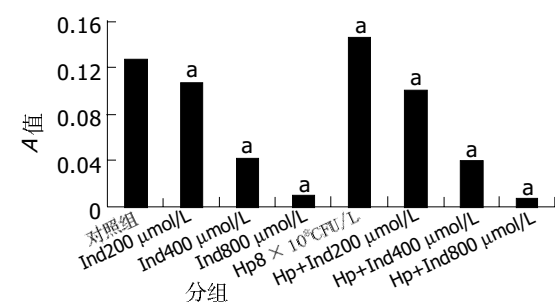


图3 NCTC11637(8×10^8 CFU/L)和不同浓度消炎痛对 AGS 细胞活力的影响. ($^aP < 0.05$ vs 对照组).

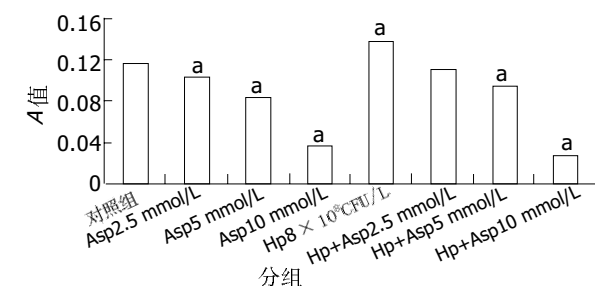


图4 NCTC11637(8×10^8 CFU/L)和不同浓度的阿司匹林对 AGS 细胞活力的影响. ($^aP < 0.05$ vs 对照组).

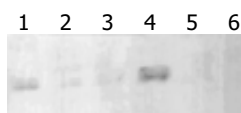


图5 AGS细胞PCNA蛋白质印迹结果. 1: 正常对照组; 2: Indomethacin 400 μmol/L; 3: Aspirin 10 mmol/L; 4: *H. pylori*; 5: *H. pylori* + Indomethacin 400 μmol/L; 6: *H. pylori* + Aspirin 10 mmol/L.

2.4 透射电子显微镜观察凋亡 在正常对照组和 *H. pylori* 干预组的细胞染色质分布均匀, 核仁易见(图7A), 在 NSAID 干预组和 *H. pylori*+NSAID 联合作用组, 可见较多凋亡细胞, 表现为早期凋亡的细胞核染色体呈颗粒状边集于核膜下, 以及后期的核固缩, 核碎裂, 膜发泡, 凋亡小体的形成等(图7B, C).

2.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳 在消炎痛 400 μmol/L 以及 *H. pylori*+消炎痛 400 μmol/L 的联合作用组, DNA 琼脂糖凝胶电泳带显示出“梯形”条带, 而在正常对照组, *H. pylori* 组, 阿司匹林 10 mmol/L 组, *H. pylori*+阿司匹林 10 mmol/L 联合作用组, 未发现有“梯形”条带(图6).

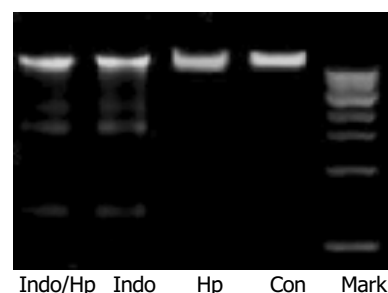


图6 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果 Ind/*H. pylori*: *H. pylori*+Indomethacin 400 μmol/L.

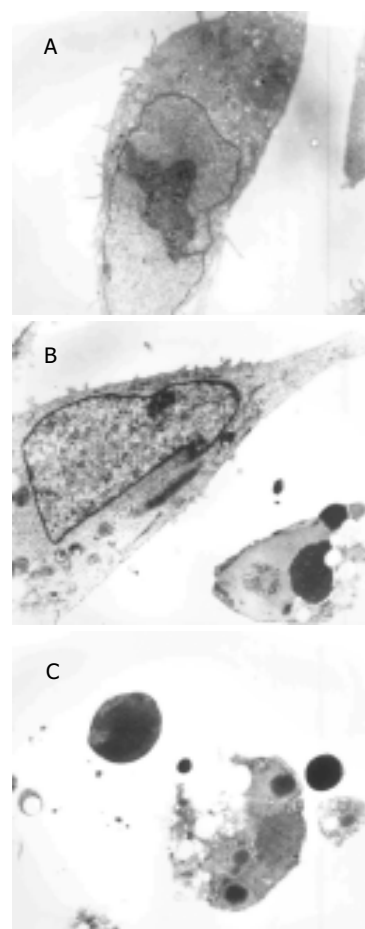


图7 细胞凋亡的超微结构 TEM. A: 正常细胞染色质分布均匀, 核仁易见($\times 2000$); B: 凋亡细胞核染色体发生固缩, 碎裂, 膜发泡现象($\times 5000$); C: 凋亡晚期, 核碎裂, 细胞质内空泡, 见凋亡小体($\times 6000$).

3 讨论

胃上皮细胞的更新非常迅速, 细胞增生和细胞凋亡是维持胃肠道黏膜完整性的重要因素. 关于 *H pylori* 感染与胃上皮细胞增生的关系, 过去的研究以不同的方法显示增生率有所升高或不变^[1-3]. 本研究发现, *H pylori* 对胃上皮细胞活力的影响与其作用浓度有关, 在低浓度($3.2 \times 10^7 - 4 \times 10^9$ CFU/L)时, CagA 阳性的 NCTC11637 菌株可促进胃上皮细胞的生长活力, 而 CagA 阴性的 NCTC12908 却未表现出明显的促生长作用, 当浓度达到 2×10^{10} CFU/L 时, 则均表现为明显的抑制生长的效应. 这有助于解释诸多报道中 *H pylori* 对胃上皮细胞生长的影响的不一致性可能与采用的浓度和菌株不同有关, 并且提示感染 CagA 阳性的 *H pylori* 菌株的患者发展为胃癌的危险性更高.

多项流行病学研究及动物实验已经证实了 NSAID 能够减少胃肠道肿瘤的发生率及死亡率. 关于 NSAID 的抗肿瘤作用机制目前还不甚明确, 已经提出的观点主要有以下四点: (1) NSAID 可通过抑制肿瘤细胞的增生从而抑制肿瘤的生长^[4]. (2) NSAID 可通过诱导细胞凋亡抑制肿瘤的生长^[5-8]. (3) 有人认为是 COX 具有活化黄曲霉素等致癌原的作用, 而 NSAID 可抑制 COX 的活动从而干预癌症的发生^[9]. (4) COX 的产物前列腺素 E2 降低 HLA II 类分子的基因转录水平的表达, 而 HLA II 类分子参与抗原提呈给 T 淋巴细胞的过程, 所以前列腺素 E2 抑制了识别肿瘤抗原的过程, 从而使肿瘤细胞逃脱了宿主的免疫杀伤作用, 而 NSAID 可提高 HLA II 类分子的基因转录水平的表达, 从而加强免疫系统消除肿瘤细胞的能力^[10-11]. 本研究结果显示 NSAID 可抑制胃上皮细胞的增生, 并诱导细胞凋亡增强, 这证明了 NSAID 至少可通过这两条途径达到抗肿瘤的作用. 虽然 DNA 琼脂糖凝胶电泳法未发现 Asp 组和 *H pylori*+Asp 联合作用组有梯形条带的形成, 分析原因可能是 DNA 琼脂糖凝胶电泳主要检测凋亡晚期, 且凋亡率须大于 8% 以上的细胞才能出现典型的梯形条带, 而通过电子显微镜, FITC-Annexin-v/PI 双染色流式细胞仪检测凋亡等技术均发现 Asp 干预组和 *H pylori*+Asp 联合作用组凋亡细胞增加, 这提示不能单靠一种方法确定凋亡的有无.

关于 *H pylori* 和 NSAID 的相互作用目前还存在争议. 临床研究的结果均存在差异^[12]. 我们的研究结果发现 CagA 阳性的 NCTC11637 菌株能促进胃癌细胞系 AGS 的增生, 而与消炎痛, 阿司匹林等 NSAID 共同作用于 AGS 时, 则表现为抑制生长的作用, 并且诱导细胞凋亡的增强, 但较 NSAID 单独作用组降低, 即 NSAID 能够抵消 *H pylori* 的促增生作用, 而 *H pylori* 也能拮抗 NSAID 的促凋亡作用.

关于二者对胃上皮细胞影响的相互拮抗作用机制目前还不清楚. Konturek *et al*^[13]通过体内研究发现 *H pylori* 感染可使黏膜胃泌素和 COX-2 的表达增强, 陆红 *et al*^[14]也曾报道 *H pylori* 感染的胃黏膜组织及胃癌组织

中 COX-2 的表达增强, 胃泌素是一个有效的促细胞分裂剂, 而 COX-2 是一个有力的肿瘤生长促进因子及血管生长因子, 可促进前列腺素的合成从而促进细胞的增生, 并可增加上皮细胞对凋亡的抵抗性^[15]. *H pylori* 感染可能通过以上途径刺激胃上皮细胞增生, 而 NSAID 可抑制 COX-2 从而抑制胃黏膜 PG 的合成, 抑制胃上皮细胞黏液和碳酸氢盐的分泌, 降低胃黏膜血流量和胃上皮的更新速度^[16], 并通过抑制 COX-2 而诱导胃肠道黏膜细胞的凋亡. Kim *et al*^[12]也报道幽门螺杆菌感染的胃上皮细胞的 COX-2 表达增强, 而 COX-2 可增加上皮细胞对凋亡的抵抗性, 当加入选择性 COX-2 抑制剂 NS-398 后, *H pylori* 感染的胃上皮细胞的凋亡明显增加, 并伴随 Caspase-3 的活化, 而且这种效应可被前列腺素 E2 所逆转. 这提示 NSAID 可通过下调 COX-2 的表达, 抑制前列腺素的生成这一途径促进细胞凋亡, 从而拮抗 *H pylori* 的促增生作用. p53 是进化过程中高度保守的蛋白, 其主要生物学功能为引起细胞周期停滞, 诱导凋亡和促进分化. Zhu *et al*^[17]报道消炎痛诱导胃上皮细胞凋亡与野生型 p53 以及 *c-myc* 表达的上调有关. 而 *H pylori* 感染能够诱导 p53 的点突变或过度表达, 促进基因的不稳定性从而导致不典型增生或肿瘤, 而根除 *H pylori* 后能逆转胃上皮过度增生状态并减少 p53 的积累^[18-20]. 这些研究与本研究结果都一致证明了 NSAID 与幽门螺杆菌之间的相互拮抗关系, 如能进一步检测各种干预下 COX-2 和 p53, *c-myc*, bak, bax 等肿瘤相关基因的表达, 将有助于从分子角度明确 *H pylori* 导致胃癌的发生机制, NSAID 对胃黏膜损伤的机制及 NSAID 的抗肿瘤机制, 为将来胃癌的防治提供新的思路.

4 参考文献

- 1 Fan XG, Kelleher D, Fan XJ, Xia HX, Keeling PW. *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells. *Gut* 1996;38:19-22
- 2 Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α /beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2154-2163
- 3 Rokkas T, Ladas S, Liatsos C, Petridou E, Papatheodorou G, Theocharis S, Karameris A, Raptis S. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Dig Dis Sci* 1999;44:487-493
- 4 Shiff SJ, Koutsos MI, Qiao L, Rigas B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Exp Cell Res* 1996;222:179-188
- 5 Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, Rigas B. Sulindac Sulfide, an aspirin-like compound, inhibit proliferation, cause cell cycle quiescence, and induce apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest* 1995;96:491-503
- 6 Zhu GH, Wong BC, Ching CK, Lai KC, Lam SK. Differential apoptosis by indomethacin in gastric epithelial cells through the constitutive expression of wild-type p53 and /or up-regulation of *c-myc*. *Biochem Pharmacol* 1999;58:193-200
- 7 Castano E, Dalmau M, Barragan M, Pueyo G, Bartrons R, Gil J. Aspirin induces cell death and caspase-dependent

- phosphatidylserine externalization in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Br J Cancer* 1999;81:294-299
- 8 Zhu GH, Wong BC, Slosberg ED, Eggo MC, Ching CK, Yuen ST, Lai KC, Soh JW, Weinstein IB, Lam SK. Overexpression of protein kinase C-beta1 isoenzyme suppresses indomethacin-induced apoptosis in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2000;118:507-514
- 9 Shiff SJ, Rigas B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and colorectal cancers: Evolving Concepts of their chemopreventive actions. *Gastroenterology* 1997;113:1992-1998
- 10 Arvind P, Papavassiliou ED, Tsioulis GJ, Qiao L, Lovelace CI, Duceman B, Rigas B. Prostaglandin E2 down-regulation the expression of HLA-DR antigen in human colon adenocarcinoma cell lines. *Biochemistry* 1995;34:5604-5609
- 11 Rigas B, Tsioulis GJ, Allan C, Wali RK, Brasitus TA. The effect on bile acids and piroxicam on MHC antigen expression in rat colonocytes during colon cancer development. *Immunology* 1994;83:319-323
- 12 Zhu GH, Yang XL, Lai KC, Ching CK, Wong BC, Yuen ST, Ho J, Lam SK. Nonsteroidal antiinflammatory drugs could reverse *Helicobacter pylori*-induced apoptosis and proliferation in gastric epithelial cells. *Dig Dis Sci* 1998;43:1957-1963
- 13 Konturek PC, Hartwich A, Zuchowicz M, Labza H, Pierzchalski P, Karczewska E, Bielanski W, Hahn EG, Konturek SJ. *Helicobacter pylori*, gastrin and cyclooxygenases in gastric cancer. *J Physiol Pharmacol* 2000;51(4 Pt 1):737-749
- 14 陆红, 陈晓宇, 刘文忠, 彭延申, 萧树东. 幽门螺杆菌感染对胃黏膜环氧合酶-2 表达的影响. *中华消化杂志* 2001;5:287-289
- 15 Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. Upregulated cyclooxygenase-2 inhibits apoptosis of human gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 2000;45:2436-2443
- 16 Franco L, Talamini G, Carra G, Doria D. Expression of COX-1, COX-2, and inducible nitric oxide synthase protein in human gastric antrum with *Helicobacter pylori* infection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1999;58:9-17
- 17 Zhu GH, Wong BC, Ching CK, Lai KC, Lam SK. Differential apoptosis by indomethacin in gastric epithelial cells through the constitutive expression of wild-type p53 and /or up-regulation of c-myc. *Biochem Pharmacol* 1999;58:193-200
- 18 Murakami K, Fujioka T, Okimoto T, Mitsuishi Y, Oda T, Nishizono A, Nasu M. Analysis of p53 gene mutations in *Helicobacter pylori*-associated gastritis mucosa in endoscopic biopsy specimens. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:474-477
- 19 Hibi K, Mitomi H, Koizumi W, Tanabe S, Saigenji K, Okayasu I. Enhanced cellular proliferation and p53 accumulation in gastric mucosa chronically infected with *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Pathol* 1997;108:26-34
- 20 Hsu PI, Lai KH, Chien EJ, Lin CK, Lo GH, Jou HS, Cheng JS, Chan HH, Hsu JH, Ger LP, Hsu PN, Tseng HH. Impact of bacterial eradication on the cell proliferation and p53 protein accumulation in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Anti-cancer Res* 2000;20:1221-1228
- 21 Kim TI, Lee YC, Lee KH, Han JH, Chon CY, Moon YM, Kang JK, Park IS. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae of mice: apoptosis, cell proliferation, and inflammatory activity. *Infect Immun* 2001;69:5056-5063

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 办刊宗旨

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》的任务是及时报道和刊登国内外、特别是我国消化病学者具有创造性的、有较高学术水平的基础和临床研究论文、研究快报等。对具有中国特色的研究论文, 如食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合和基于作者自己研究工作为主的综述性论文, 将优先发表, 使 WJG 成为我国消化疾病临床和基础科学研究对外学术交流的窗口和我国优秀医务工作者走向世界的桥梁。

Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 收录 *World Journal of Gastroenterology*

本刊讯 在 2004 年 11 月, Nature Publishing Group 将会出版一系列杂志, 题为自然临床实践, 包括肿瘤、心血管、泌尿、胃肠病学和肝脏病学, 这些文章会应用于临床患者和医生。Nature Publishing Group 收录非常有影响的杂志, *World Journal of Gastroenterology* 也被收录。Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 为非常繁忙的胃肠病学家和肝脏病学家提供其专业的概况和其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为他们患者提供进一步的帮助。Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 提供电子和印刷版, 其主编为 Stephen Hanauer. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

酸性成纤维细胞生长因子对缺血再灌注小肠绒毛细胞内 *bax* 和 *bcl-2* 表达的影响

陈伟, 付小兵, 葛世丽, 孙同柱, 赵京禹, 都义日, 盛志勇

陈伟, 付小兵, 孙同柱, 赵京禹, 都义日, 盛志勇, 中国人民解放军 304 医院全军创伤修复重点实验室 北京市 100037
葛世丽, 军事医学科学院放射医学研究所 北京市 100850
陈伟, 男, 1972-09-10 生, 安徽省安庆市人, 汉族, 2000 年军事医学科学院博士毕业, 助理研究员, 主要从事创伤修复基础和临床应用研究。
国家重点基础研究规划资助 No. 973, G1999054204
国家自然科学基金资助 No. 30170966, 30230370
项目负责人: 付小兵, 100037, 北京市阜成路 51 号, 中国人民解放军 304 医院全军创伤修复重点实验室, fuxb@cgw.net.cn
电话: 010-66867396 传真: 010-68480755
收稿日期: 2004-05-30 接受日期: 2004-06-24

Effects of extrogenous aFGF on *bax* and *bcl-2* expression in intestinal cells after ischemia/reperfusion

Wei Chen, Xiao-Bing Fu, Shi-Li Ge, Tong-Zhu Sun, Jing-Yu Zhao, Yi-Ri Du, Zhi-Yong Sheng

Wei Chen, Xiao-Bing Fu, Tong-Zhu Sun, Jing-Yu Zhao, Yi-Ri Du, Zhi-Yong Sheng, Key Research Laboratory of Wound Repair, 304th Hospital of PLA, Beijing 100037, China
Shi-Li Ge, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medicine Sciences, Beijing 100850, China
Supported by National Basic Science and Development Programme, 973 Programme, No. G1999054204 and National Natural Science Foundation of China, No. 30170966, No. 30230370
Correspondence to: Dr. Xiao-Bing Fu, Key Research Laboratory of Wound Repair, 304th Hospital of PLA, 51 Fucheng Road, Beijing 100037, China. fuxb@cgw.net.cn
Received: 2004-05-30 Accepted: 2004-06-24

Abstract

AIM: To detect the effects of acid fibroblast growth factor (aFGF) on apoptosis and Bax and bcl-2 expression in rat intestine after I/R injury, and to explore the protective mechanisms of aFGF on intestinal villus.

METHODS: One hundred and eight Wistar rats were randomly divided into 4 groups, namely intestinal ischemia/reperfusion group (R, $n=48$), intestinal ischemia group (I, $n=6$), aFGF treatment group (A, $n=48$) and sham-operated group (C, $n=6$). The rats sustained 45 min of arteria mesenterica (SMA) occlusion to establish the ischemia model. At the beginning of reperfusion, rats in group R and A were treated with normal saline (0.15 mL) and aFGF (20 $\mu\text{g/kg}$, 0.15 mL) respectively. Then each six rats as a sub-group were reperfused for a duration of 0.25, 0.5, 1, 2, 6, 12, 24, 48 h respectively. Cell apoptotic rates in intestinal villus were determined with terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick-end-labeling technique (TUNEL). RT-PCR was used to detect the expressions of *bax* and *bcl-2* gene in intestinal villus. Immunohistochemical methods were adopted to detect *bax*

and *bcl-2* protein expressions and distributions.

RESULTS: The improvement of intestinal histological structures was observed at 2 h, 6 h and 12 h after the reperfusion in group A, compared with group R. The apoptotic rates were (41.17 \pm 3.49 %), (42.83 \pm 5.23 %) and (53.33 \pm 6.92 %) at 2, 6, 12 h after reperfusion respectively in group A, and these rates were significantly lower than those in group R ($P<0.05$). The expressions of *bax* gene and *bax* protein in intestinal villus were gradually increased after ischemia/reperfusion, while the transcription of *bcl-2* gene and expression of *bcl-2* protein were decreased. During the 2-12 h of reperfusion, the transcription of *bcl-2* gene and expression of *bcl-2* protein were significantly increased in group A compared with those in group R ($P<0.05$). However, the expressions of *bax* gene and *bax* protein were significantly higher than those in group R ($P<0.05$).

CONCLUSION: Intravenous aFGF could alleviate I/R-induced injury, in which its effects on the facilitation of *bcl-2* transcription and inhibition of *bax* expression may play an important role.

Chen W, Fu XB, Ge SL, Sun TZ, Zhao JY, Du YR, Sheng ZY. Effects of extrogenous aFGF on *bax* and *bcl-2* expression in intestinal cells after ischemia/reperfusion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2599-2604

摘要

目的: 探讨外源性酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)对大鼠肠缺血再灌注后小肠绒毛细胞凋亡以及凋亡相关基因 *bax* 和 *bcl-2* 表达的影响。

方法: 采用肠系膜上动脉(SMA)夹闭45 min后松夹造成缺血再灌注(I/R)损伤的动物模型, 将108只Wistar大鼠随机分成假手术组(C)、肠缺血组(I)、肠缺血-再灌注组(R)和aFGF治疗组(A)。根据缺血后再灌注时间的不同又将R组和A组又分成0.25, 0.5, 1, 2, 6, 12, 24和48 h共8组, 每组6只动物。A组和R组在松开动脉夹的同时, 分别经尾静脉注入20 $\mu\text{g/kg}$ aFGF和生理盐水0.15 mL。各时相点取小肠组织, 通过末端脱氧核糖转移酶介导的生物素化脱氧尿嘧啶核苷标记技术(TUNEL)检测细胞凋亡率; 利用免疫组织化学方法检测 *bax* 和 *bcl-2* 蛋白表达; 用RT-PCR方法测定 *bax* 和 *bcl-2* 基因的表达水平。

结果: 缺血再灌注后2, 6, 和12 h, A组中鼠小肠绒毛组织的细胞凋亡率分别为(41.17 \pm 3.49%), (42.83 \pm 5.23%)和(53.33 \pm 6.92%), 显著低于C组中各对应时间点上的细

胞凋亡率($P<0.05$)。I/R后小肠绒毛细胞内 *bax* 基因表达逐渐增强, 蛋白含量升高, 而 *bcl-2* 基因转录迅速降低, 蛋白含量减少。在再灌注 2-12 h, A 组中 *bcl-2* 基因转录水平和蛋白含量均较 C 组增加, 而 *bax* 基因的 mRNA 含量和蛋白水平均较 C 组降低。

结论: 外源性 aFGF 能够减轻缺血再灌注对小肠绒毛的损伤, 其机制可能与 aFGF 促进 *bcl-2* 基因转录、抑制 *bax* 基因表达相关。

陈伟, 付小兵, 葛世丽, 孙同柱, 赵京禹, 都义日, 盛志勇. 酸性成纤维细胞生长因子对缺血再灌注小肠绒毛细胞内 *bax* 和 *bcl-2* 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2599-2604

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2599.asp>

0 引言

在腹部外伤、失血性休克、严重创伤、感染、烧伤等病理状态下, 常出现肠道缺血再灌注损伤和功能障碍, 肠屏障功能降低, 肠内细菌和毒素通过受损肠黏膜进入体循环, 激活网状内皮系统, 引起大量炎症递质和细胞因子释放, 造成全身炎症反应综合征和多器官功能衰竭的发生。因此采取有效措施减轻外界胁迫作用对肠道损害有着至关重要的作用。近年来研究发现, 外源性酸性成纤维因子(aFGF)可减轻心、肾、骨骼肌等的缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡发生^[1-2]。细胞凋亡是由凋亡相关基因编码的蛋白调节控制, 其中 *bcl-2* 家族成员起着十分重要的作用^[3-7]。为此, 我们以大鼠肠 I/R 损伤为模型, 给予静脉注射外源性 aFGF, 观察小肠组织细胞凋亡的变化规律及其可能的调节机制, 为临床应用 aFGF 促进肠道损伤的修复提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 Wister 大鼠(军事医学科学院动物中心) 108 只, 体质量 220 ± 20 g, 随机分为假手术组(C, $n=6$), 单纯缺血组(I, $n=6$), 肠 I/R 组(R, $n=48$) 和 aFGF 治疗组(A, $n=48$)。根据缺血再灌注时间不同(15 min, 30 min, 1, 2, 6, 12, 24 和 48 h), 将 R 组和 A 组又分成 R15 min, R30 min, R1, R2, R6, R12, R24, R48 h 和 A15 min, A30 min, A1, A2, A6, A12, A24, A48 h, 共 16 组, 每组 6 只。采用肠系膜上动脉(SMA)夹闭 45 min 后松夹, 复制肠道缺血再灌注模型。经腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后, 分离 SMA 根部。C 组仅分离 SMA 根部但不夹闭, 其余各组动物在肠系膜上动脉根部用微血管夹夹闭, 完全阻断

血流 45 min, 然后松夹形成再灌注。R 组和 A 组分别于 SMA 夹闭 45 min 松夹, 即刻从尾静脉注射生理盐水(0.15 mL)或 aFGF(20 μ g/kg, 0.15 mL)。按设定时间点活杀动物。在无菌的条件下, 取距离回盲部上端 10 cm 以上的肠管, 一部分立即液氮冻存, 用于进行逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR); 另一部分标本经 40 g/L 中性甲醛液固定, 脱水, 石蜡包埋后切片, 4 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2 方法

1.2.1 细胞凋亡检测 将石蜡切片(厚 5 μ m)脱蜡, 梯度乙醇脱水, 甩干后用蛋白酶 K 在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 min, 然后用 PBS 冲洗 2 次, 加 50 μ L 末端脱氧核糖转移酶介导的生物素化脱氧尿嘧啶缺口标记技术(TUNEL)的反应液(德国 Boehringer Mannheim 公司产品), 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。在用 PBS 冲洗 3 次后加 50 μ L 亲和素辣根过氧化物酶, 37 $^{\circ}$ C 湿盒放置 30 min, PBS 冲洗 3 次, 最后用 DAB 显色 15 min, 苏木素复染并系列脱水封片。在 400 倍光镜下观察, 细胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞。

1.2.2 小肠组织中 *bax* 和 *bcl-2* 蛋白含量的检测 采用免疫组织化学 SP 法。*bax*(SC-7480)、*bcl-2*(SC-7382)的抗体和 SP 试剂盒均购自 Santa Cruz 公司。实验操作按试剂盒说明书进行, 将石蜡切片脱蜡至水并进行抗原热修复后, 系列染色, 其中一抗用抗体稀释液按 1:100 稀释。光镜观察, 结果以胞质或/和胞核着棕色者为阳性染色。另用 PBS 代替一抗为阴性对照。随机选取 60 个小肠绒毛组织, 计数阳性染色细胞数, 并计算阳性细胞率。

1.2.3 *bax* 和 *bcl-2* 基因转录的检测 提取 C 组、I 组、R 组和 A 组的小肠组织细胞的总 RNA, 用紫外分光分析和凝胶电泳检测所提取总 RNA 的质量和浓度。按照 PolyATtract[®] mRNA Isolation System 系统分离纯化 mRNA, 紫外分光分析其纯度。采用 RT-PCR 方法。每份样品取等量 mRNA, 用 Promega 公司的逆转录试剂盒(A3500), 按说明书进行 cDNA 的合成。根据人 *bax*, *bcl-2* 和 β -actin 基因的 cDNA 序列, 按照引物设计原则设计引物, 引物序列(见表1)。PCR 的条件为: 变性: 94 $^{\circ}$ C, 3 min 扩增: 94 $^{\circ}$ C (30 s), 60 $^{\circ}$ C (30 s), 72 $^{\circ}$ C (30 s); 延伸: 72 $^{\circ}$ C, 10 min。每个基因进行 32 个循环。所有样品取等量的模板进行 PCR 扩增。取 PCR 产物 5 μ L, 在 15 g/L 琼脂糖中电泳后紫外光下扫描; 用凝胶图像分析系统(UVP-GDS800, 英国)对目的基因的表达产物进行灰密度测定。基因表达量是以目的基因与 β -actin 基因的灰密度值的比值表示。

统计学处理 借助 SPSS11.0 软件对结果进行统计学

表 1 RT-PCR 反应检测 *bax*, *bcl-2* and β -actin 基因表达的引物序列

基因	上游引物	下游引物
<i>bax</i>	5' -AGGTCCTTTTCCGAGTGGCAGC-3'	5' -CCCGGAGGAAGTCCAATGTCC-3'
<i>bcl-2</i>	5' -GACTTCGCCGAGATGTCCAG-3'	5' -GTGCAGGTGCCGGTTCAGG-3'
β -actin	5' -AGCCATGTACCTAGCCATCC-3'	5' -GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'

处理, 各组数据均以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD, $n=6$)表示. 阳性率资料组间采用ANOVA 方差分析和SNK 多重比较检测.

2 结果

小肠组织在缺血再灌注后早期病变较轻, 表现为黏膜和黏膜下层充血、水肿, 固有层多量中性粒细胞浸润, 少数可见黏膜上皮脱落. 在缺血再灌注后6–12 h, 黏膜大片糜烂, 固有层有大量淋巴细胞、巨噬细胞及中性粒细胞浸润. 再灌注后24 h小肠黏膜结构基本恢复到正常黏膜结构. aFGF 治疗后, 小肠黏膜充血、水肿、炎性细胞及上皮糜烂坏死的程度在各时间点均较R 组显著改善, 以再灌注后2 和6 h 最为明显.

2.1 细胞凋亡的变化 大鼠缺血再灌注后, 小肠组织中细胞凋亡率逐渐升高. 再灌注后1 h, 细胞凋亡率明显高于假手术组; 缺血再灌注后12 h, 小肠绒毛细胞凋亡率升至最高, 是C 组的3.3 倍, 此后, 细胞凋亡率恢复到C 组水平. aFGF 治疗后, 缺血再灌注的小肠组织中的阳性细胞率虽也呈升高趋势, 但增加幅度均低于R 组. 在缺血再灌注后2–12 h, A 组中的细胞凋亡率明显低于R 组中相应的时间点($P<0.05$), 再灌注后24 h, 小肠绒毛细胞的细胞凋亡率与R 组相比差异不显著(表2).

表2 aFGF 对缺血再灌注损伤的小肠绒毛组织内细胞凋亡率的影响($n=6$, mean \pm SD, %)

分组	R 组	A 组
C 组	19.7 \pm 3.5	19.7 \pm 3.5
I 组	27.7 \pm 9.6	27.7 \pm 9.6
再灌注后 15 min	29.5 \pm 5.6	25.2 \pm 6.4
再灌注后 30 min	31.0 \pm 5.0 ^a	26.0 \pm 4.9
再灌注后 1 h	34.7 \pm 5.5 ^a	32.8 \pm 7.1 ^a
再灌注后 2 h	50.7 \pm 7.0 ^a	41.2 \pm 3.5 ^{ac}
再灌注后 6 h	54.2 \pm 7.9 ^a	42.8 \pm 5.2 ^{ac}
再灌注后 12 h	64.3 \pm 6.5 ^a	53.3 \pm 6.9 ^{ac}
再灌注后 24 h	28.5 \pm 5.5	23.3 \pm 3.8
再灌注后 48 h	26.0 \pm 5.8	22.0 \pm 4.6

^a $P<0.05$ vs C 组; ^c $P<0.05$ vs R 组中相应的时间.

2.2 bax 和 bcl-2 蛋白的表达 在正常大鼠的小肠绒毛中 bax 蛋白主要分布于小肠绒毛顶端细胞的细胞质中. 缺血和再灌注的初期, bax 蛋白的表达未发生明显改变, 随着再灌注时间的延长, bax 蛋白的表达水平逐渐升高, 并且在小肠绒毛的各层细胞内都有该蛋白的阳性表达颗粒. 缺血再灌注后2–12 h, bax 蛋白的阳性细胞率显著高于C 组, 再灌注后24 h, bax 蛋白的阳性细胞率又降低至C 组水平. aFGF 治疗后, 再灌注后2–12 h 期间, 小肠绒毛组织细胞中的 bax 阳性细胞率明显低于R 组($P<0.05$, 表3, 图1). C 组大鼠小肠绒毛上皮细胞表达较多的 bcl-2 蛋白, 该蛋白主要分布于隐窝和绒毛黏膜细胞的胞质和胞核内. 缺血和再灌注的初期, bcl-2 蛋白的阳性细胞率未发生明显改变, 随着再灌注时间的延长逐渐增强, 该蛋白阳性细胞率逐渐降低. 在缺血再灌注后1 h, 阳性细胞率明显低于C 组($P<0.05$), 缺血再灌注后24 h, 阳性表达率又恢复到C 组水平. aFGF 治疗组较R 相应时间点 bcl-2 表达水平增加, 在缺血再灌注后2–12 h 期间, bcl-2 蛋白在A 组中的阳性细胞率都显著高于R 组中各相应的时间点($P<0.05$)(表3, 图2).

表3 aFGF 对缺血再灌注损伤小肠组织细胞内 bax 和 bcl-2 蛋白表达影响($n=6$, mean \pm SD, %)

分组	bax		bcl-2	
	R 组	A 组	R 组	A 组
C 组	19.8 \pm 3.7	19.8 \pm 3.7	35.3 \pm 4.6	35.3 \pm 4.6
I 组	23.8 \pm 7.7	23.8 \pm 7.7	28.2 \pm 4.1	28.2 \pm 4.1
再灌注后 15 min	25.0 \pm 5.9	19.8 \pm 5.3	29.8 \pm 6.1	31.2 \pm 5.0
再灌注后 30 min	28.0 \pm 9.2	20.3 \pm 4.8	28.8 \pm 5.9	30.2 \pm 6.0
再灌注后 1 h	37.8 \pm 4.8 ^a	24.2 \pm 4.5 ^c	24.5 \pm 6.2 ^a	26.0 \pm 5.1 ^a
再灌注后 2 h	47.7 \pm 7.3 ^a	37.5 \pm 7.0 ^{ac}	20.7 \pm 7.2 ^a	29.7 \pm 4.8 ^c
再灌注后 6 h	54.7 \pm 5.3 ^a	47.0 \pm 3.5 ^{ac}	18.8 \pm 5.4 ^a	27.8 \pm 2.7 ^c
再灌注后 12 h	46.3 \pm 4.3 ^a	37.7 \pm 3.8 ^{ac}	19.5 \pm 4.4 ^a	25.7 \pm 4.0 ^{ac}
再灌注后 24 h	29.0 \pm 4.4	25.0 \pm 4.3	28.7 \pm 2.9	29.3 \pm 6.0
再灌注后 48 h	26.2 \pm 3.5	22.8 \pm 3.2	29.0 \pm 3.7	30.5 \pm 4.9

^a $P<0.05$ vs C 组; ^c $P<0.05$ vs R 组中相应的时间.

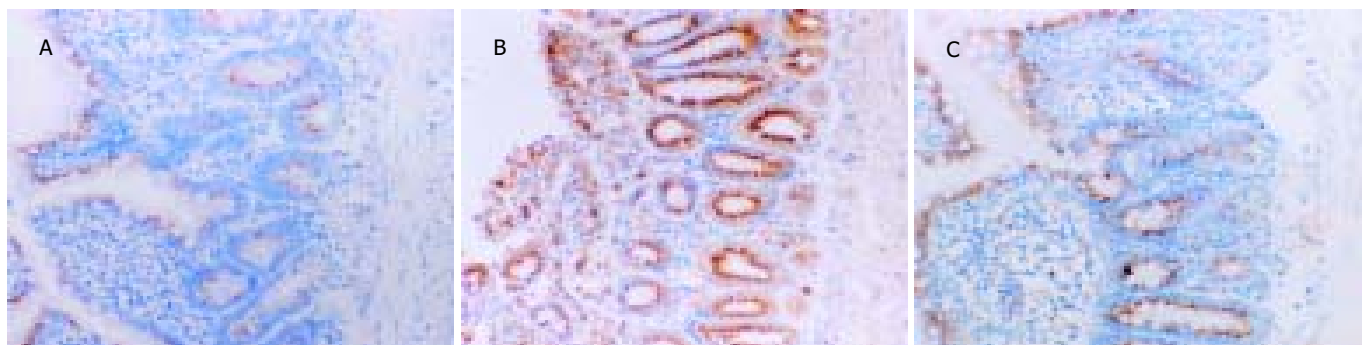


图1 不同处理的小肠组织中 bax 蛋白的表达变化. A: sham-operated group; B: 6 h after ischemia-reperfusion in R group; C: 6 h after ischemia-reperfusion in A group. bax 蛋白在假手术组大鼠小肠细胞内表达较低; 而在缺血再灌注6 h 后的小肠绒毛细胞内呈强阳性表达, 蛋白颗粒主要分布于小肠绒毛细胞的胞质内; 缺血再灌注6 h 后的aFGF 处理组的小肠绒毛细胞内 bax 蛋白表达水平明显低于缺血再灌注组.

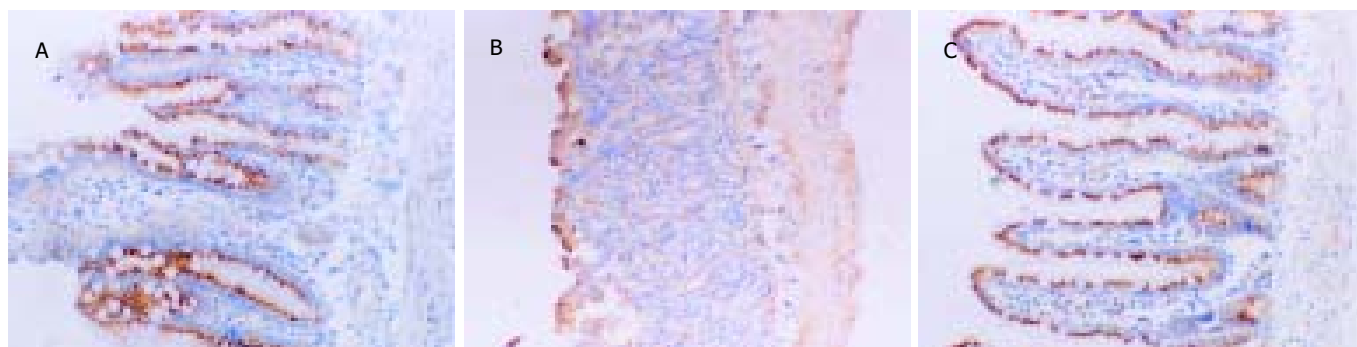


图2 不同处理的小肠组织中 *bcl-2* 蛋白的表达变化. (A) sham-operated group; B: 6 h after ischemia-reperfusion in R group; C: 6 h after ischemia-reperfusion in A group. *bcl-2* 蛋白在假手术组的大鼠小肠绒毛细胞内呈强阳性表达, 蛋白颗粒主要分布于小肠绒毛细胞的胞质和胞核内; 缺血再灌注 6 h 后, R 组的小肠绒毛细胞内 *bcl-2* 蛋白表达水平降低; 缺血再灌注 6 h 后的 aFGF 处理组的小肠绒毛细胞内 *bcl-2* 蛋白含量明显高于缺血再灌注组.

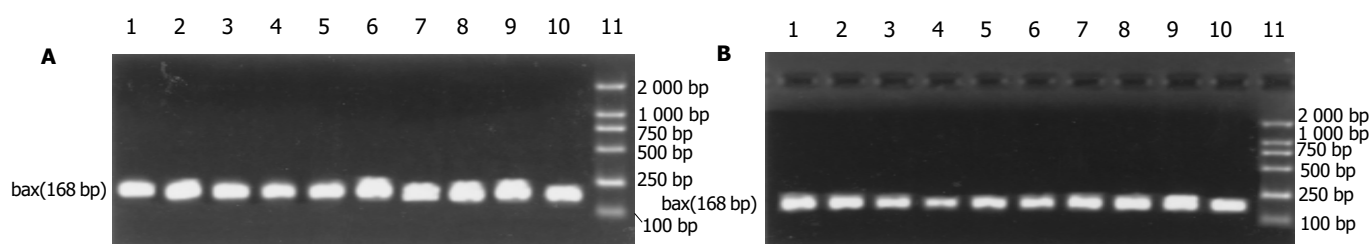


图3 在(A)缺血再灌注组和(B)aFGF 处理组的小肠组织中 *bax* 基因转录的变化. 1: 再灌注后 48 h; 2: 再灌注后 24 h; 3: 再灌注后 12 h; 4: 再灌注后 6 h; 5: 再灌注后 2 h; 6: 再灌注后 1 h; 7: 再灌注后 30 min; 8: 再灌注后 15 min; 9: 缺血组; 10: 假手术组; 11: DL2000 marker.

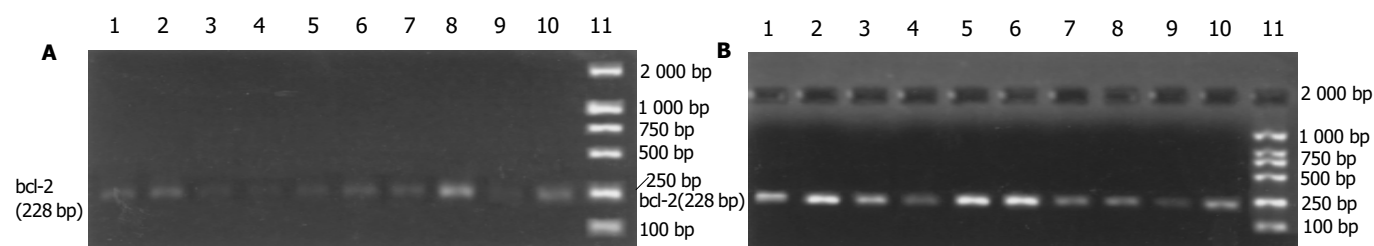


图4 在(A)缺血再灌注组和(B)aFGF 处理组的小肠组织中 *bcl-2* 基因转录的变化. 1: 再灌注后 48 h; 2: 再灌注后 24 h; 3: 再灌注后 12 h; 4: 再灌注后 6 h; 5: 再灌注后 2 h; 6: 再灌注后 1 h; 7: 再灌注后 30 min; 8: 再灌注后 15 min; 9: 缺血组; 10: 假手术组; 11: DL2000 marker.

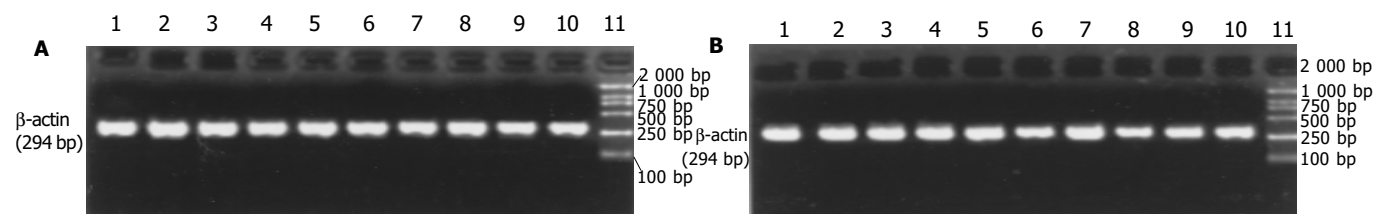


图5 在(A)缺血再灌注组和(B)aFGF 处理组的小肠组织中 β -actin 基因转录的变化. 1: 再灌注后 48 h; 2: 再灌注后 24 h; 3: 再灌注后 12 h; 4: 再灌注后 6 h; 5: 再灌注后 2 h; 6: 再灌注后 1 h; 7: 再灌注后 30 min; 8: 再灌注后 15 min; 9: 缺血组; 10: 假手术组; 11: DL2000 marker.

2.3 *bax* 和 *bcl-2* 基因的转录 *bax* 和 *bcl-2* 基因的 mRNA 经 RT-PCR 扩增后, 得到特异性的 DNA 片段长度分别为 168 bp 和 228 bp (图 3, 4). 如表 4 所示, 缺血和再灌注可导致小肠绒毛细胞内 *bax* 基因转录迅速增加, 在再灌注后 1 h 达到高峰, 然后降低到与 C 组相近的水平. aFGF 治疗后, 缺血再灌注的小肠组织细胞内 *bax* 基因转录量都低于 R 组, 其中在再灌注后 15 min, 1, 2 和 6 h 呈显著性差异变化 ($P < 0.05$, 图 3). 不同处理的小肠组织细胞内 *bcl-2* 基因转录的变化规律与 *bax* 基因

不同. 缺血和再灌注可导致 *bcl-2* 基因转录水平显著低于 C 组 ($P < 0.05$). aFGF 治疗的大鼠小肠组织细胞内, 在缺血再灌注 15 min 后, *bcl-2* 基因转录就明显低于 C 组, 并且这一变化趋势直至再灌注后 6 h; 在再灌注后 12-48 h 期间, 小肠组织细胞中 *bcl-2* 基因的 mRNA 含量恢复至 C 组水平. 除再灌注后 15 min 时间点外, 在其他再灌注各时间点上, aFGF 治疗组中小肠组织内 *bcl-2* 基因表达水平都显著高于 R 组中各相应的时间点 ($P < 0.05$, 表 4, 图 4). 在不同处理的小肠绒毛中, 作为内参的

β -actin 基因都有表达,并且表达量没有显著性差异 ($P>0.05$,图5).

表4 aFGF对缺血再灌注损伤小肠组织细胞内 *bax*和 *bcl-2* 基因转录影响($n=6$, mean \pm SD, %)

分组	<i>bax</i>		<i>bcl-2</i>	
	R组	A组	R组	A组
C组	81.0 \pm 8.1	85.7 \pm 7.5	24.6 \pm 3.2	27.8 \pm 3.3
I组	106.0 \pm 8.9 ^a	97.8 \pm 9.6 ^a	11.2 \pm 2.8 ^a	10.7 \pm 3.5 ^a
再灌注后 15 min	93.9 \pm 3.3 ^a	83.9 \pm 6.7 ^c	23.1 \pm 4.6	20.5 \pm 5.0 ^a
再灌注后 30 min	94.1 \pm 4.6 ^a	94.3 \pm 3.7	12.9 \pm 3.1 ^a	18.0 \pm 1.7 ^{ac}
再灌注后 1 h	108.4 \pm 12.7 ^a	76.1 \pm 6.3 ^c	11.8 \pm 3.2 ^a	20.5 \pm 2.2 ^{ac}
再灌注后 2 h	90.2 \pm 6.6	76.7 \pm 6.2 ^c	9.1 \pm 2.2 ^a	20.7 \pm 1.5 ^{ac}
再灌注后 6 h	85.8 \pm 6.0	62.4 \pm 3.5 ^{ac}	6.5 \pm 2.5 ^a	15.5 \pm 1.8 ^{ac}
再灌注后 12 h	87.0 \pm 6.3	80.2 \pm 6.8	7.9 \pm 2.1 ^a	27.3 \pm 3.6 ^c
再灌注后 24 h	85.2 \pm 9.1	90.5 \pm 5.1	15.9 \pm 2.4 ^a	30.4 \pm 2.3 ^c
再灌注后 48 h	86.7 \pm 7.3	94.8 \pm 14.4	14.8 \pm 3.3 ^a	23.9 \pm 2.7 ^c

^a $P<0.05$ vs C组;^c $P<0.05$ vs R组中相应的时间.

3 讨论

小肠绒毛组织对缺血再灌注的作用十分敏感,小肠 I/R 损伤可能会导致细菌和毒素通过肠道屏障进入机体血液,改变小肠组织中炎症因子、细胞因子和生长因子的浓度,导致肠绒毛细胞凋亡的增加^[8-13].我们发现,缺血再灌注能够导致小肠绒毛细胞凋亡增加,发生凋亡的细胞位置从正常小肠绒毛顶端扩展到整个小肠绒毛组织;aFGF能够减少缺血再灌注后小肠上皮细胞的凋亡率,小肠绒毛结构明显改善.aFGF抑制缺血再灌注后小肠上皮细胞凋亡的机制是什么,成为人们所关注的热点.以往的研究结果表明,凋亡相关基因表达的变化可能在缺血再灌注影响心肌细胞^[14]、脑组织细胞^[15]、骨骼肌细胞^[16]、皮肤细胞^[17]和肾上腺皮质细胞^[18]的细胞凋亡过程中起重要的作用.为此本研究探讨了aFGF治疗后,缺血再灌注小肠绒毛细胞内凋亡相关蛋白 *bax*和 *bcl-2* 表达的变化规律,以期揭示aFGF抗凋亡的机制.

细胞凋亡可能由凋亡相关基因编码的蛋白调节控制,是多种促进因素和抑制因素共同作用的结果.*bcl-2* 家族成员是细胞凋亡过程中的一类调节因子,该基因家族包含两类功能相反的基因,一类是抑制细胞凋亡的基因如 *bcl-2* 基因,另一类为包含 *bax* 等基因在内的促进细胞凋亡的基因^[19-21].*bcl-2* 基因的表达产物广泛分布于线粒体、内质网膜和核膜上.*bax* 蛋白是一种可溶性分子,主要位于细胞质中,与 *bcl-2* 具有同源性.*bcl-2* 和 *bax* 都能以同源二聚体形式存在,他们之间也可形成异二聚体.当外界信号引起细胞凋亡时, *bax* 转移到线粒体并与线粒体膜相结合,两个 *bax* 蛋白相互聚合形成同二聚体,作为细胞色素C通过线粒体膜进入胞质的通道,促进细胞凋亡.当 *bcl-2* 基因表达增强,细胞内

bcl-2 蛋白含量升高时,越来越多的 *bax-bax* 二聚体相互分开,与 *bcl-2* 形成比 *bax-bax* 更稳定的 *bax-bcl-2* 异二聚体,从而抑制 *bax* 的促凋亡作用^[22-27].我们发现,从缺血再灌注 30 min 开始,导致小肠组织细胞凋亡率就明显升高,再灌注 12 h 后,细胞凋亡率升至最高,而 aFGF 治疗后,大鼠小肠组织细胞凋亡率明显减少,小肠组织结构显著改善;另外本研究结果还显示,缺血再灌注导致 *bax* 基因表达迅速增强,蛋白含量的变化规律与细胞凋亡的规律相似,在缺血再灌注 2-12 h 期间显著高于假手术组,而 aFGF 治疗则导致小肠组织中 *bax* 基因表达和蛋白含量显著降低;缺血再灌注导致 *bcl-2* 基因表达和蛋白含量明显降低,而 aFGF 则抑制 *bcl-2* 基因和蛋白表达水平降低.这提示, *bcl-2/bax* 比例降低可能是缺血再灌注导致小肠组织细胞凋亡率增加的机制之一,而 aFGF 治疗后, *bcl-2/bax* 蛋白比例升高,可能是 aFGF 抑制细胞趋向凋亡,减轻缺血再灌注对肠道损伤的机制.另外,我们还发现,缺血再灌注 30 min 后,小肠绒毛细胞凋亡率开始升高,再灌注 24 h 后,细胞凋亡率恢复到假手术组水平.这一变化的原因可能是由于在缺血再灌注初期,凋亡促进基因,如 *bax* 基因表达增强,蛋白含量升高,而凋亡抑制蛋白,如 *bcl-2* 表达降低.随着再灌注时间的延长,机体通过自身调控和主动修复,凋亡促进基因和凋亡抑制基因的转录水平恢复到正常,抑制小肠绒毛细胞凋亡的发生,减弱缺血再灌注对机体的损伤,但此时大鼠的生命体征较差,精神萎靡,食欲不振;而 aFGF 处理后,但经过长时间的缺血再灌注,大鼠的生命体征明显好于 R 组,存活率也显著提高.另外本研究还发现,在缺血再灌注初期即再灌注 30 min,小肠绒毛细胞的凋亡率和 *bax* 基因转录水平都显著升高,而 aFGF 处理后这两种指标与对照组相比无明显增多.这提示在机体损伤后,应及时利用 aFGF 进行治疗,减轻外界胁迫作用对小肠绒毛细胞的损伤.

总之,使用外源性 aFGF 能够减轻缺血再灌注对大鼠小肠绒毛组织的损伤,其原因可能是由于 aFGF 通过影响凋亡相关基因,如 *bax* 和 *bcl-2* 基因转录和蛋白表达,抑制缺血再灌注引起的细胞凋亡增加,保护肠屏障免受损伤和破坏.由于 aFGF 具有多种生物功能,本研究只是从两种凋亡调控蛋白的表达水平变化的一个侧面探索 aFGF 治疗缺血再灌注的调控机制,但尚有许多问题需进一步研究,例如 aFGF 是怎样调控 *bcl-2* 和 *bax* 等基因表达;与细胞凋亡密切相关的几种重要的生长因子与上述基因调节网络的关系;其他与细胞凋亡相关的基因是否参与调控小肠绒毛的细胞凋亡等方面都有待进一步探讨.

4 参考文献

- 1 Cuevas P, Carceller F, Martinez-Coso V, Asin-Cardiel E, Gimenez-Gallego G. Fibroblast growth factor cardioprotection against ischemia-reperfusion injury may involve K⁺ ATP

- channels. *Eur J Med Res* 2000;5:145-149
- 2 Fu XB, Cuevas P, Gimenez-Gallego G, Sheng ZY, Tian HM. Acidic fibroblast growth factor reduces rat skeletal muscle damage caused by ischemia and reperfusion. *Chin Med J* 1995; 108:209-214
- 3 Srinivasan A, Li F, Wong A, Kodandapani L, Smidt R Jr, Krebs JF, Fritz LC, Wu JC, Tomaselli KJ. bcl-xL functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis of MCF7 breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998;273:4523-4529
- 4 Mills JC, Lee VM, Pittman RN. Activation of a PP2A-like phosphatase and dephosphorylation of tau-protein characterize onset of the execution phase of apoptosis. *J Cell Sci* 1998;111(Pt 5):625-636
- 5 Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Matsuo S, Aw TY. Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Am J Physiol* 1998;274(2 Pt 1):G270-G276
- 6 Cory S, Huang DC, Adams JM. The bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22:8590-8607
- 7 Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. bcl-2 prolongs cell survival after bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998;391:496-499
- 8 Fu XB, Xing F, Yang YH, Sun TZ, Guo BC. Activation of phosphorylating-p38 mitogen-activated protein kinases and its relationship with localization of intestinal stem cells in rats after ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2003;9: 2036-2039
- 9 Fu XB, Yang YH, Sun TZ, Chen W, Li JY, Sheng ZY. Rapid mitogen-activated protein kinase by basic fibroblast growth factor in rat intestine after ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2003;9:1312-1317
- 10 Wang XJ, Wei JG, Wang CM, Wang YC, Wu QZ, Xu JK, Yang XX. Effect of cholesterol liposomes on calcium mobilization in muscle cells from the rabbit sphincter of Oddi. *World J Gastroenterol* 2002;8:144-149
- 11 Yin ZY, Ni XD, Jiang F, Li N, Li YS, Wang XM, Li JS. Auxiliary en-bloc liver-small bowel transplantation with partial pancreas preservation in pigs. *World J Gastroenterol* 2004;10:1499-1503
- 12 黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇. 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12:464-466
- 13 张连阳, 王正国, 朱佩芳, 秦红军, 唐苏雅拉图. 大鼠失血性休克复苏后肠屏障功能障碍. *世界华人消化杂志* 2001;9:767-770
- 14 Chang TH, Liu XY, Zhang XH, Wang HL. Effects of dI-praeruptorin A on interleukin-6 level and Fas, bax, bcl-2 protein expression in ischemia-reperfusion myocardium. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:769-774
- 15 Zhou HY, Ma Y, Zhou Y, Liu Z, Wang K, Chen G. Effects of magnesium sulfate on neuron apoptosis and expression of caspase-3, bax and bcl-2 after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:1532-1534
- 16 Hatoko M, Tanaka A, Kuwahara M, Yurugi S, Iioka H, Niitsuma K. Difference of molecular response to ischemia-reperfusion of rat skeletal muscle as a function of ischemic time: study of the expression of p53, p21^{WAF-1}, bax protein, and apoptosis. *Ann Plast Surg* 2002;48:68-74
- 17 Hatoko M, Tanaka A, Kuwahara M, Yurugi S. Molecular response to ischemia-reperfusion of rat skin: study of expression of p53, p21WAF-1, and bax proteins, and apoptosis. *Ann Plast Surg* 2001;47:425-430
- 18 Baskin DS, Ngo H, Didenko VV. Thimerosal induces DNA breaks, caspase-3 activation, membrane damage, and cell death in cultured human neurons and fibroblasts. *Toxicol Sci* 2003;74:361-368
- 19 Deng W, Wang DA, Gosmanova E, Johnson LR, Tigyi G. LPA protects intestinal epithelial cells from apoptosis by inhibiting the mitochondrial pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G821-G829
- 20 陈伟, 付小兵, 孙同柱, 孙晓庆, 赵志力, 盛志勇. bax 和 bcl-2 在增生性瘢痕中的表达特征及其意义. *创伤外科杂志* 2002;4:276-278
- 21 陈伟, 付小兵, 孙同柱, 赵志力, 盛志勇, 王振辉. 皮肤溃疡伤口中 bax 和 bcl-2 蛋白含量的变化及其与溃疡发生的关系. *现代康复* 2001;5:54-55
- 22 Chang YC, Xu YH. Expression of bcl-2 inhibited Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells. *Cell Res* 2000;10:233-242
- 23 Guo BC, Xu YH. bcl-2 over-expression and activation of protein kinase C suppress the trail-induced apoptosis in Jurkat T cells. *Cell Res* 2001;11:101-106
- 24 Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demareux N, Krause KH. bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5723-5728
- 25 Zhang M, Zhang HQ, Xue SB. Effect of bcl-2 and caspase-3 on calcium distribution in apoptosis of HL-60 cells. *Cell Res* 2000; 10:213-220
- 26 Gross A, Pilcher K, Blachly-Dyson E, Basso E, Jockel J, Bassik MC, Korsmeyer SJ, Forte M. Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X (L). *Mol Cell Biol* 2000;20:3125-3136
- 27 Cui J, Engelman RM, Maulik N, Das DK. Role of ceramide in ischemic preconditioning. *J Am Coll Surg* 2004;198:770-777

HSP70在慢性情绪应激中对胃黏膜保护作用

朱熊兆, 彭敏, 姚树桥

朱熊兆, 彭敏, 姚树桥, 中南大学湘雅二院医学心理中心
湖南省长沙市 410011
朱熊兆, 女, 1965-03-13 生, 湖南省双峰县人, 汉族, 1987 年湖南医科大学
本科毕业, 2000 年中南大学湘雅医学院博士毕业, 副教授, 主要从事心身疾
病方面的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30170326
湖南省自然科学基金资助项目, No. 01JJY2085
项目负责人: 朱熊兆, 410011, 湖南省长沙市人民路 156 号, 中南大学湘雅
二医院医学心理中心. xiongzhao1@hotmail.com
电话: 0731-5361982
收稿日期: 2004-09-07 接受日期: 2004-09-19

Protective effect of HSP70 on gastric mucosal cells against apoptosis

Xiong-Zhao Zhu, Min Peng, Shu-Qiao Yao

Xiong-Zhao Zhu, Min Peng, Shu-Qiao Yao, Clinical Psychology
Research Center, Second Xiangya Hospital, Central South University,
Changsha 410011, Hunan Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No.
30170326, and Natural Science Foundation of Hunan Province, No.
01JJY2085
Correspondence to: Xiong-Zhao Zhu, The Clinical Psychology Re-
search Center, Second Xiangya Hospital, Central South University,
Changsha 410011, Hunan Province, China. shuqiaoyao@hotmail.com
Received: 2004-09-07 Accepted: 2004-09-19

Abstract

AIM: To investigate whether HSP70 can protect gastric mucosal cells from apoptosis induced by chronic emotional stress.

METHODS: Seventy mice were randomly divided into control group ($n = 16$), heat shock stress group (HS, $n = 18$), psychological stress group (PS, $n = 18$), heat shock stress plus psychological stress group (HPS, $n = 18$). Mice in HS, PS and HPS groups were subjected to heat shock stress, psychological stress, and heat shock stress plus psychological stress respectively. Apoptosis of gastric mucosal cells and the expression level of HSP70 were detected by TUNEL technique and immunohistochemical staining respectively after 1, 2, and 3 mo.

RESULTS: After 1 mo, apoptotic cells among the 4 groups were not significant. After 2 mo, apoptotic rate in PS group was significantly higher than control group ($3.7 \pm 1.9\%$ vs $1.3 \pm 1.4\%$, $P = 0.017 < 0.05$), HS group ($3.7 \pm 1.9\%$ vs $1.2 \pm 1.6\%$, $P = 0.010 < 0.05$), and HPS group ($3.7 \pm 1.9\%$ vs $1.3 \pm 1.1\%$, $P = 0.012 < 0.05$). After 3 mo, apoptotic rate in PS group was significantly higher than that in control group ($4.1 \pm 3.9\%$ vs $1.0 \pm 1.1\%$, $P = 0.025 < 0.05$), HS group ($4.1 \pm 3.9\%$ vs $0.4 \pm 0.7\%$, $P = 0.009 < 0.05$), and HPS group ($4.1 \pm 3.9\%$ vs $1.4 \pm 1.5\%$, $P = 0.046 < 0.05$). After 1 mo, HSP70 level was significantly higher in HS group and HPS group than that in control group ($64 \pm 11\%$ vs $20 \pm 11\%$, $P = 0.00 < 0.05$; $72 \pm 6\%$ vs $20 \pm 11\%$, $P = 0.00 < 0.05$) and psy-

chological stress group ($64 \pm 11\%$ vs $34 \pm 15\%$, $P = 0.00 < 0.05$; $72 \pm 6\%$ vs $34 \pm 15\%$, $P = 0.00 < 0.05$). After 2 mo, HSP70 level was significantly higher in HS and HPS group than that in control group ($84 \pm 13\%$ vs $25 \pm 15\%$, $P = 0.00 < 0.05$; $87 \pm 7\%$ vs $25 \pm 15\%$, $P = 0.00 < 0.05$) and PS group ($84 \pm 13\%$ vs $46 \pm 30\%$, $P = 0.02 < 0.05$; $87 \pm 7\%$ vs $46 \pm 30\%$, $P = 0.01 < 0.05$). After 3 mo, HSP70 level was also significantly higher in HS and HPS group than those in control group ($61 \pm 16\%$ vs $16 \pm 9\%$, $P = 0.02 < 0.05$; $65 \pm 29\%$ vs $16 \pm 9\%$, $P = 0.01 < 0.05$) and PS group ($61 \pm 16\%$ vs $33 \pm 29\%$, $P = 0.09 < 0.05$; $65 \pm 29\%$ vs $33 \pm 29\%$, $P = 0.046 < 0.05$). HSP70 level was negatively correlated with apoptotic rate of gastric mucosal cells ($r = -0.320$, $P = 0.008 < 0.05$).

CONCLUSION: Chronic emotional stress can induce apoptosis of gastric mucosal cells while HSP70 can protect them from apoptosis.

Zhu XZ, Peng M, Yao SQ. Protective effect of HSP70 on gastric mucosal cells against apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11): 2605-2609

摘要

目的: 探讨HSP70对心理应激导致的胃黏膜细胞凋亡是否具有保护作用及其可能的作用机制。

方法: 野生型小鼠 70 只, 随机分为对照组($n = 16$), 热应激组($n = 18$), 心理应激组($n = 18$), 热应激加心理应激组($n = 18$), 分别不给予任何实验应激, 给予热应激, 心理应激, 以及热应激加心理应激。用免疫组化和TUNEL法分别在 1, 2, 3 mo 时段对胃黏膜细胞凋亡率和 HSP70 表达情况进行检测, 比较同一时段不同组之间的差异, 并探讨 HSP70 表达与胃黏膜细胞凋亡的关系。

结果: 1 mo 时段, 胃黏膜细胞凋亡发生率在各组没有显著性差异(对照组, 热应激组, 心理应激组, 热应激加心理应激组分别为 $0.5 \pm 0.4\%$, $0.5 \pm 0.8\%$, $1.3 \pm 1.2\%$, $0.9 \pm 1.3\%$, $F = 0.706$, $P = 0.561 > 0.05$)。在 2 mo 时段心理应激组胃黏膜细胞凋亡发生率显著高于对照组($3.7 \pm 1.9\%$ vs $1.3 \pm 1.4\%$, $P = 0.017 < 0.05$), 热应激组($3.7 \pm 1.9\%$ vs $1.2 \pm 1.6\%$, $P = 0.010 < 0.05$), 热应激加心理应激组($3.7 \pm 1.9\%$ vs $1.3 \pm 1.1\%$, $P = 0.012 < 0.05$)。3 mo 时段心理应激组胃黏膜细胞凋亡发生率显著高于对照组($4.1 \pm 3.9\%$ vs $1.0 \pm 1.1\%$, $P = 0.025 < 0.05$), 热应激组($4.1 \pm 3.9\%$ vs $0.4 \pm 0.7\%$, $P = 0.009 < 0.05$), 热应激加心理应激组($4.1 \pm 3.9\%$ vs $1.4 \pm 1.5\%$, $P =$

0.046<0.05). 在1 mo时段, 热应激组, 热应激加心理应激组 HSP70 表达率均分别显著高于对照组($64 \pm 11\%$ vs $20 \pm 11\%$, $P=0.00<0.05$, $72 \pm 6\%$ vs $20 \pm 11\%$, $P=0.00<0.05$) 和心理应激组($64 \pm 11\%$ vs $34 \pm 15\%$, $P=0.00<0.05$, $72 \pm 6\%$ vs $34 \pm 15\%$, $P=0.00<0.05$). 在2mo时段, 热应激组, 热应激加心理应激组 HSP70 表达率均分别显著高于对照组($84 \pm 13\%$ vs $25 \pm 15\%$, $P=0.00<0.05$, $87 \pm 7\%$ vs $25 \pm 15\%$, $P=0.00<0.05$) 和心理应激组($84 \pm 13\%$ vs $46 \pm 30\%$, $P=0.02<0.05$, $87 \pm 7\%$ vs $46 \pm 30\%$, $P=0.01<0.05$). 在3 mo时段, 热应激组, 热应激加心理应激组 HSP70 表达率均分别显著高于对照组($61 \pm 16\%$ vs $16 \pm 9\%$, $P=0.02<0.05$, $65 \pm 29\%$ vs $16 \pm 9\%$, $P=0.01<0.05$) 和心理应激组($61 \pm 16\%$ vs $33 \pm 29\%$, $P=0.09<0.05$, $65 \pm 29\%$ vs $33 \pm 29\%$, $P=0.046<0.05$). HSP70 表达率与胃黏膜细胞凋亡率呈负相关($r = -0.320$, $P = 0.008$).

结论: 慢性心理应激使胃黏膜细胞凋亡发生率增加, HSP70 可以降低胃黏膜细胞凋亡发生率, 在应激性溃疡的预防和治疗有重要的应用价值.

朱熊兆, 彭敏, 姚树桥. HSP70 在慢性情绪应激中对胃黏膜保护作用. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2605-2609

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2605.asp>

0 引言

心理生理应激可损伤哺乳动物应激易感器官, 其中脑和胃是主要的易感器官^[1], 可引起应激性溃疡. 关于心理应激在胃溃疡的诱发和加重中所起的作用是十分复杂的, 如果能够找到一种对胃黏膜细胞起到直接保护作用, 并提高细胞抗应激能力的方法, 将会降低应激性溃疡发病的可能性^[2].

热休克蛋白尤其是HSP70可能在应对有害刺激使细胞易于存活的过程中起着重要的作用^[1,3-7]. 心理应激能否引起胃黏膜细胞 HSP70 表达, 在应激性溃疡发生或加重过程中的作用机制尚不清楚, 因此, 对热应激和心理应激过程中胃黏膜细胞 HSP70 的表达、凋亡及其关系进行观察如下.

1 材料和方法

1.1 材料 采用美国德克萨斯大学西南医学实验中心培育的 HSF1 基因敲除杂合子进行交配, 经PCR基因型鉴定所得的野生型小鼠^[8]. 所有小鼠在中南大学湘雅二医院实验动物中心饲养, 近交繁殖, 群养, 3-5只/盒. 选取2月龄小鼠入组. 饲养条件为: 光照12 h/d (8:00/20:00), 室温 $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 相对湿度60%, 照度220 lux, 屏蔽环境, 饲料、垫料以及饮水都经过严格的消毒. 入组动物70只, 随机分为A, B, C, D组. A组为对照组16只, B组为热应激组18只, C组为心理应激组18只, D组为心理应激加热应激组18只. 入组动物在1,

2, 3 mo 三个时间段进行行为观察, 24 h后断头处死, 取所需标本.

1.2 方法 A组动物置于一安静环境中, 不接受任何实验性应激. B组动物为热应激组, 每周接受一次热应激. C组为心理应激组, 接受限制应激和饮水冲突应激. D组为心理应激加热应激组, 在接受限制应激和饮水冲突应激的基础上, 每周接受1次热应激. 心理应激包括饮水冲突应激和限制应激. 饮水冲突应激根据 Vogel 冲突模型和Geller-Seifter冲突模型设计而成^[9]. 限制应激是将小鼠限制在一狭小的容器内(直径4 cm, 长为8 cm), 限制其活动范围, 使动物产生无助和抑郁的情绪, 每次限制30 min-1.5 h, 容器开口以保证充足的氧气供应. 热应激方法是根据既往研究经验, 反复进行预试验而设计的, 具体的方法是将一支体温计插入小鼠直肠内约3 cm处, 然后将动物放于一个自制的加热舱内进行加热. 舱内相对湿度约为60%. 待其直肠温度达到 42°C 时停止加热, 动物的直肠温度能保持在 42°C 达15 min^[10-13]. 小鼠处死后, 取胃组织, 洗净胃内容物, 取胃溃疡好发部位: 胃大弯至胃小弯连线处胃黏膜, 立即用40 g/L多聚甲醛固定, 蒸馏水漂洗, 梯度脱水, 石蜡包埋, 切片.

1.2.1 TUNEL 法检测胃黏膜细胞凋亡 石蜡切片常规脱蜡入水. 切片浸入8.5 g/L NaCl, 0.1 mol/L PBS洗5 min \times 1次. 30 mL/L H_2O_2 室温10 min 消除内源性过氧化物酶. 在40 g/L多聚甲醛/1 \times PBS中固定15 min. 0.1 mol/L PBS洗5 min \times 1次. 每片组织滴加20 mg/L的蛋白酶K, 室温下消化30 min, 0.1 mol/L PBS洗5 min \times 1次. 滴加平衡缓冲液100 μL 平衡10 min. 每片组织滴加98 μL 平衡缓冲液, 生物素化脱氧核苷酸1 μL , TdT酶混合液1 μL , 4°C 过夜. 2 \times SSC 浸泡30 min, 终止反应. 0.1 mol/L PBS洗5 min \times 3次. 1:500 稀释链酶亲和素HRP, 滴加100 μL 于组织片, 室温下反应20 min, 0.1 mol/L PBS洗5 min \times 3次. DAB显色, 显微镜下控制反应时间, 蒸馏水冲洗. 苏木素轻度复染. 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片.

1.2.2 免疫组化检测HSP70的表达 石蜡切片常规脱蜡入水. 30 mL/L H_2O_2 室温10 min 消除内源性过氧化物酶. 抗原热修复: 将切片浸入0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液中, 微波加热至沸腾, 冷却5 min, 再次加热至沸腾, 冷却. 0.1 mol/L PBS洗2 min \times 2次. 滴加正常山羊血清封闭液, 室温20 min. 滴加一抗 4°C 过夜, 0.1 mol/L PBS洗2 min \times 3次. 滴加生物素化山羊抗小鼠IgG, 室温15 min, 0.1 mol/L PBS洗2 min \times 3次. 滴加SABC室温15 min, 0.1 mol/L PBS洗5 min \times 4次, DAB显色, 显微镜下控制反应时间, 蒸馏水冲洗. 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片. 在400倍显微镜下, 同等光强度下, 每张切片随机观察5个视野, 计数每个视野的细胞总数和阳性细胞数, 算出每个视野的阳性率, 5个视野阳性率的均数为此切片的阳性率. HSP70阳性细胞主要表现在: 胞质呈棕黄色, 胞核透明, 少数胞核

也呈棕黄色. 胃膜细胞凋亡阳性细胞主要表现为: 胞核固缩, 呈棕黄色.

统计学处理 用SPSS for Windows 11.5进行统计分析. 采用均数 \pm 标准差 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较用最小显著性差异法, 相关分析采用 Pearson 相关, $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 胃膜细胞凋亡 在 1 mo 时段, 各组之间胃黏膜细胞凋亡(图 1)率没有显著性差异($P = 0.561$); 在 2 和 3 mo 时段, 结果显示各组之间的胃黏膜细胞凋亡率差异显著, 两两比较后表明心理应激组胃黏膜细胞凋亡率显著高于对照组, 热应激组和热应激加心理应激组($P < 0.05$, 表1). 为了了解处理因素与时间因素对胃黏膜细胞凋亡的交互作用, 以胃黏膜细胞凋亡水平为统计指标, 作两因素三水平方差分析, 结果发现心理应激($F = 9.774$, $P = 0.003$), 热应激($F = 6.025$, $P = 0.017$), 以及热应激和心理应激($F = 4.174$, $P = 0.046$)的交互作用对胃黏膜细胞凋亡有显著作用($P < 0.05$). 时间因素作用不显著($P > 0.05$).

表1 各组胃膜细胞凋亡率比较(mean \pm SD, %)

分组	1 mo	2 mo	3 mo
A: 对照组	0.5 \pm 0.4	1.3 \pm 1.4	1.0 \pm 1.1
B: 热应激组	0.5 \pm 0.8	1.2 \pm 1.6 ^a	0.4 \pm 0.7 ^a
C: 心理应激组	1.3 \pm 1.2	3.7 \pm 1.9	4.1 \pm 3.9
D: 心理应激加热应激组	0.9 \pm 1.3	1.3 \pm 1.1	1.4 \pm 1.5

^a $P < 0.05$ vs A, B, D 组.

2.2 胃膜细胞 HSP70 表达 在 1, 2 和 3 mo 时段, 热应激组和热应激加心理应激组的 HSP70 表达(图 2)水平均显著高于对照组和心理应激组($P < 0.05$, 表 2), 而心理应激组与对照组比较差异亦不显著($P > 0.05$). HSP70 诱导表达率的与胃黏膜细胞凋亡率成负相关($r = -0.320$, $P = 0.008$).

表2 各组胃膜细胞 HSP70 表达水平(mean \pm SD, %)

分组	1 mo	2 mo	3 mo
A: 对照组	20 \pm 11	25 \pm 15	16 \pm 9
B: 热应激组	64 \pm 11 ^a	84 \pm 13 ^a	61 \pm 16 ^a
C: 心理应激组	34 \pm 15	46 \pm 30	33 \pm 29
D: 心理应激加热应激组	72 \pm 6 ^a	87 \pm 7 ^a	65 \pm 29 ^a

^a $P < 0.05$ vs A, C 组.

3 讨论

我们的研究结果提示心理应激诱发并加重了胃黏膜细胞凋亡. 传统的观念认为胃溃疡发生时细胞是被动的坏死, 但近年来的研究表明, 胃黏膜细胞凋亡在胃溃疡发病中有着重要的作用, 并认为胃黏膜细胞凋亡与增生的失衡是溃疡发生的一个重要原因^[13]. 已有研究证明心理应激可使胃黏膜表皮增生率被抑制, 并且发现急性胃黏膜损害时胃黏膜细胞凋亡发生率增高^[14-16], 这一结果提示热应激对心理应激所致的胃黏膜损伤具有一定的保护作用. 为了了解其保护机制, 我们对应激过程中胃黏膜细胞 HSP70 的表达进行了观察. 既往的研究已经证明热应激可使细胞内 HSP70 的表达增加十几倍到几十倍, 主要分布在胞质, 线粒体和细胞核中^[17].

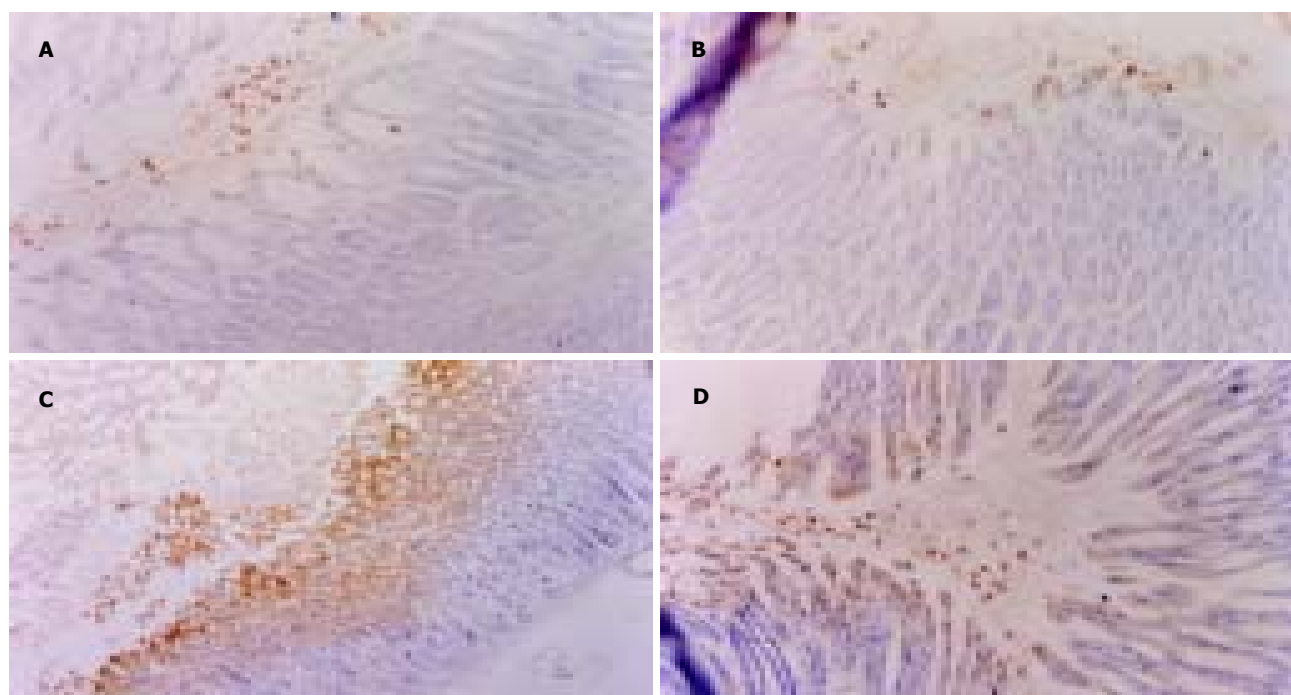


图1 处理 3 mo 胃膜细胞凋亡, $\times 200$. A: 对照组; B: 热应激; C: 心理应激, $\times 100$; D: 热应激加心理应激.

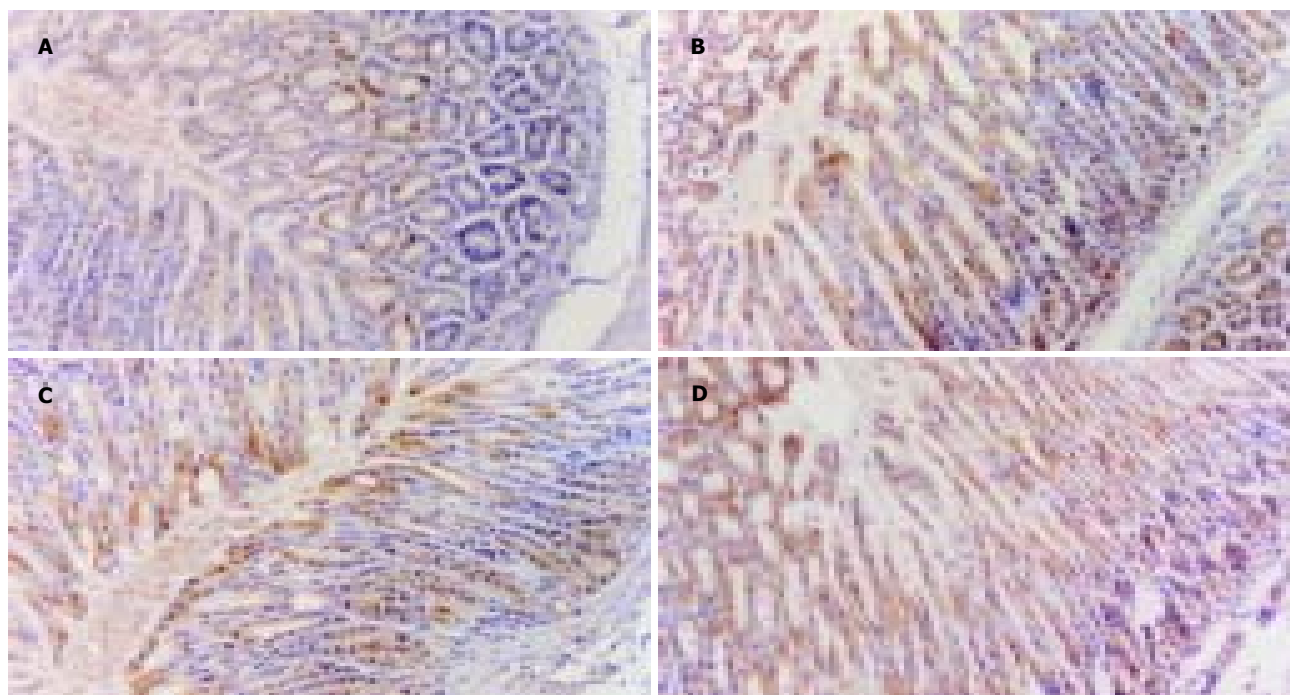


图2 处理3 mo胃膜细胞HSP70表达. A: 对照组; B: 热应激组; C: 心理应激组; D: 热应激加心理应激组.

本结果表明,在实验的各个时段,热应激组及热应激加心理应激组的HSP70表达水平均显著高于心理应激组.与热应激组比较,热应激加心理应激组胃黏膜细胞的HSP70表达水平有升高的趋势,但无显著性差异,提示热应激诱导了HSP70表达,这与以往研究结果一致^[17].而单纯的心理应激未能引起HSP70表达水平显著升高,这可能与心理应激的强度、持续时间,尤其是心理应激后检测的时间有关,有待于进一步研究.热应激加心理应激组凋亡率显著低于心理应激组,经相关分析发现胃黏膜细胞凋亡率与HSP70表达水平呈负相关关系,即HSP70表达水平越高,胃黏膜细胞凋亡率越低.这表明热应激预处理诱导表达的HSP70在心理应激诱导的胃黏膜细胞凋亡中起到了一定的保护作用.

在心理应激过程中,HSP70对细胞的保护可能是通过影响细胞凋亡的通路来起作用^[18-19],并且HSP70还可以发挥分子伴侣的作用,减少应激诱导的细胞内蛋白质变性和聚集,使损害的蛋白质重新折叠,这样一方面维持了受损伤蛋白质的正常结构,使细胞受到保护.另一方面变性的蛋白质也启动凋亡程序,HSP70减少应激诱导的蛋白质变性和聚集使变性的蛋白质启动凋亡减少^[20].

我们的研究表明,慢性心理应激可诱导或加重胃黏膜细胞凋亡的发生率,而导致应激性胃溃疡的发生和加重;HSP70在慢性心理应激引起的胃黏膜细胞凋亡中起着一定的保护作用,提示HSP70在预防心理应激引起的应激性胃溃疡的应用中有较好的前景,为身心疾病的预防 and 治疗的供一种新的方向.

4 参考文献

- 1 朱熊兆. 热休克蛋白在心理应激中的表达及其作用. 中国心理卫生杂志 2003;17:836-838
- 2 李兆申, 刘靖, 许国铭, 宛新建, 王雯. 不同抗溃疡药物对应激性溃疡发生、发展过程中细胞凋亡的影响. 胃肠病学 2003;8:11-14
- 3 Gao YJ, Xiao CF, Chen S, Wang RB, He HZ, Tanguay RM, Wu TC. In vitro study on role of Hsp70 expression in DNA damage of human embryonic lung cells exposed to Benzo[a]pyrene. *Biomed Environ Sci* 2004;17:144-152
- 4 Lee KJ, Terada K, Oyadomari S, Inomata Y, Mori M, Gotoh T. Induction of molecular chaperones in carbon tetrachloride-treated rat liver: implications in protection against liver damage. *Cell Stress Chaperones* 2004;9:58-68
- 5 Kabakov AE, Budagova KR, Bryantsev AL, Latchman DS. Heat shock protein 70 or heat shock protein 27 overexpressed in human endothelial cells during posthypoxic reoxygenation can protect from delayed apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 2003;8:335-347
- 6 Tashiro M, Ernst SA, Edwards J, Williams JA. Hyperthermia induces multiple pancreatic heat shock proteins and protects against subsequent arginine-induced acute pancreatitis in rats. *Digestion* 2002;65:118-126
- 7 袁志强, 彭毅志. 热休克蛋白70与细胞保护. 国外医学临床生物化学与检验学分册 2002;23:287-288
- 8 陈广文, 刘熠, 汤白争, 王慷慨, 肖献忠. 热休克因子1基因剔除小鼠的遗传特征及基因型分析. 上海实验动物科学 2003;23:45-47
- 9 朱熊兆, 元晓莉, 姚树桥, 彭敏. 心理应激与热应激对小鼠情绪及其学习能力的影响. 中国行为医学科学 2004;13:364-366
- 10 White DJ, Carlson D, Ordway GA, Horton JW. Protective role of heat stress in burn trauma. *Crit Care Med* 2004;32:1338-1345
- 11 Li G, Currie RW, Ali IS. Insulin potentiates expression of myocardial heat shock protein 70. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26:281-288
- 12 Chen Y, Arrigo AP, Currie RW. Heat shock treatment suppresses angiotensin II-induced activation of NF-kappaB pathway and heart inflammation: a role for IKK depletion by heat shock? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1104-1114
- 13 刘靖, 李兆申, 许国铭, 宛新建, 王雯. 细胞凋亡和增生在大鼠应激性溃疡发病中的作用. 中华消化杂志 2003;23:595-598
- 14 Shen XZ, Koo MW, Cho CH. Sleep deprivation increase the expression of inducible heat shock protein 70 in rat gastric

- mucosa. *World J Gastroenterol* 2001;7:496-499
- 15 Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Endothelin1, interleukin-4 and nitric oxide synthase modulators of gastric mucosal injury by indomethacin: effect of antiulcer agents. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:197-210
- 16 Chattopadhyay I, Nandi B, Chatterjee R, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Mechanism of antiulcer effect of Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract: effect on H⁺-K⁺-ATPase, oxidative damage and apoptosis. *Inflammopharmacology* 2004;12:153-176
- 17 Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein70kDa:molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 1998; 80:183-201
- 18 Kumar Y, Tatu U. Stress protein flux during recovery from simulated ischemia: induced heat shock protein 70 confers cytoprotection by suppressing JNK activation and inhibiting apoptotic cell death. *Proteomics* 2003;3:513-526
- 19 Kuzelova K, Grebenova D, Pluskalova M, Marinov I, Hrkal Z. Early apoptotic features of K562 cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2004;73:67-78
- 20 Gabai VL, Sherman MY. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol* 2002;92:1743-1748

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 封面故事 •

国家重点学科—第二军医大学附属长海医院消化内科

1 简介

第二军医大学附属长海医院消化内科创建于1976年,1984年成为硕士学位授予点,1986年成为博士学位授予点,1996年为临床医学博士后流动站.科室设3个标准病区及国内首家内科胰腺重症监护室,展开病床135张,其中胰腺重症监护室有病床10张.年门诊量超过6万人次,年收治总量超过1100人次.消化内镜诊治中心为中华医学会消化内镜专科医师培训中心,面积1800m²,仪器设备总值2000万元,拥有国际上最先进的内镜设备(如最新型的可变频EUS、三维EUS及扇形扫描EUS, IDUS, 胰管镜, 胆管镜, 数字减影X线成像系统等). 专科拥有先进的实验室,为全军消化疾病重点实验室,面积1000m²,仪器设备总值2000万.

2 学术地位

该学科是消化内科学国家重点学科、全军消化内科专科中心、全军消化疾病重点实验室、军队“2110工程”重点建设学科、中华医学会消化内镜专科医师培训中心、上海市内窥镜质量控制中心和第二军医大学胰腺疾病研究所,是国务院学位委员会硕士、博士学位授权点,临床医学博士后流动站.

3 学科带头人

学科带头人李兆申教授、主任医师、博士生导师,现为国务院第五届学科评议组成员、中华消化内镜学会副主任委员兼秘书、上海市消化内镜学会主任委员、上海市消化病学会委员、全军医学科学技术委员会委员、上海市医学会第33届常务理事、全军消化病学会副主任委员;担任《胰腺病学》杂志执行主编、《中华消化内镜杂志》副主编、《中华内科年鉴》副主编、《胃肠病学》、《国外医学—消化分册》、《世界华人消化杂志》、《第二军医大学学报》、《解放军医学杂志》等多本杂志的编委.获首届中国医师奖,被评为全国首届中青年医学科技之星、总后科技银星,享受国务院特殊津贴和军队二类岗位津贴.

4 技术力量

目前在职工作人员49人,教授5人,副教授4人,获博士学位者15人,获硕士学位者8人,其中5人曾到过国外对口医科大学进修学习;博士生导师3人,硕士生导师5人;在读博士后3人,博士研究生20人,硕士研究生13人.

5 临床特色

学科总体形成了五个鲜明的临床诊治特色:(1)胰腺疾病,包括胰腺癌早期诊断、胰腺癌的综合治疗、重症胰腺炎的综合救治、慢性胰腺炎的诊治;(2)消化内镜介入治疗,包括消化腔内异物取出,胰胆疾病内镜治疗,黏膜下肿瘤切除术等;(3)消化系疾病B超引导下介入治疗,治疗领域涉及肝囊肿、肝脓肿、肝癌、胰腺假性囊肿、梗阻性黄疸经皮肝穿刺胆管引流术或支架置入术;(4)胃肠动力障碍性疾病,开展多项胃肠动力检测新技术,积极开展胃食管反流病、肠易激综合征、功能性消化不良及功能性便秘的规范化诊治;(5)消化性溃疡等 *H pylori* 相关疾病的诊治,拥有先进的¹³C呼气试验检测仪,可以无创地检测有无 *H pylori* 感染,并对 *H pylori* 感染及消化性溃疡等 *H pylori* 相关性疾病进行规范诊治.

6 承担课题

学科从1996-2004年开展的科研课题有:国际合作基金2项,20万欧元;国家自然科学基金7项,86万元;军队课题5项,600万元;上海市课题6项,95万元;外资单位科研经费257万元;院“258”建设基金200万元;院学科建设规划500万元,总计近2000万元.

7 科研成果

获国家科技进步三等奖1项、军队科技进步一等奖1项、军队医疗成果一等奖1项、军队科技进步二等奖多项,上海市医疗成果二等奖多项,2002荣立集体二等功.

8 国际合作

与意大利 Siena IRIS、英国 Leeds 大学、美国 Michigan 大学建有稳定的合作关系,聘请世界消化内镜学会主席、亚太消化内镜主席等国外客座教授5人,与美国 Michigan 大学联合培养研究生两届.《胰腺病学》杂志与《Pancreas》、《Pancreatology》、《JOP》电子版建立了合作关系.

9 封面照片

图1 李兆申教授在做ERCP.图2 李兆申教授与 Soehendra 教授和 Leung 教授合影.图3 中华医学会消化内镜专科医师培训中心.图4 中国人民解放军消化疾病研究重点实验室.

10 通讯地址

200433, 上海市长海路174号, 第二军医大学附属长海医院消化内科

胆汁酸肠肝循环对消化间期移行性复合运动的作用

张珍妮, 董 蕾, 刘 欣, 李 毅

张珍妮, 董蕾, 刘欣, 西安交通大学第二医院消化内科
陕西省西安市 710004

李毅, 西安市红会医院骨科 陕西省西安市 710004

张珍妮, 女, 1977-10-31 生, 陕西省咸阳市人, 汉族, 2004 年西安交通大学第二医院医学硕士, 主任医师。

国家自然科学基金资助项目, No. 30170414

项目负责人: 董蕾, 710004, 陕西省西安市西五路 157 号, 西安交通大学第二医院消化内科, donglei4488@sina.com

电话: 029-87679272 传真: 029-87231758

收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-09-19

Effect of bile acid enterohepatic circulation on interdigestive migrating motor complex

Zhen-Ni Zhang, Lei Dong, Xin Liu, Yi Li

Zhen-Ni Zhang, Lei Dong, Xin Liu, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Yi Li, Department of Orthopedics, Red Cross Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30170414

Correspondence to: Dr. Lei Dong, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. donglei4488@sina.com

Received: 2004-08-16 Accepted: 2004-09-19

Abstract

AIM: To investigate the effects of enterohepatic circulation of bile acid on interdigestive migrating motor complex (MMC).

METHODS: The dog models of extracorporeal circulation of bile acid were established firstly ($n=12$). Then the records of MMC were observed with bile flow intact, during total external biliary diversion and after re-infusion of the bile into the dogs' duodenum respectively. At the same time, the concentration of plasma motilin (MTL) was measured under different conditions.

RESULTS: The interdigestive MMC with bile flow intact included 3 phases. The concentration of plasma MTL cycled with MMC. The level of MTL in phase III was much higher than that in phase I (433.8 ± 46.3 ng/L vs 112.6 ± 21.7 ng/L, $P=0.000<0.01$). During total external biliary diversion, phase III was not obvious. Compared with the normal period of MMC, the one during total external biliary diversion was much longer (110.2 ± 13.6 min vs 99.1 ± 14.4 min, $P=0.001<0.01$); the duration of phase I was shorter (31.0 ± 6.6 min vs 53.2 ± 9.2 min, $P=0.002<0.01$) and that of phase II was longer (79.2 ± 11.8 min vs 41.3 ± 9.9 min, $P=0.001<0.01$). The dynamic index of last 30 min of phase II was lower than that of normal (41.3 ± 6.8 mV/s vs 69.1 ± 9.2 mV/s, $P=0.001<0.01$). At the same time, the concentrations of plasma MTL did not show significant differences with the

changing of MMC. Phase III was also not obvious after re-infusion of the bile. However, compared with pre-infusion, the characteristics of MMC changed and were more similar to normal MMC.

CONCLUSION: Enterohepatic circulation of bile acid plays an important role in the maintenance of interdigestive MMC. MTL is an important factor in the initiation of phase III of MMC.

Zhang ZN, Dong L, Liu X, Li Y. Effect of bile acid enterohepatic circulation on interdigestive migrating motor complex. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2610-2613

摘要

目的: 探讨胆汁酸肠肝循环对消化间期胃肠移行性复合运动(MMC)的影响。

方法: 建立狗胆汁酸体外循环模型($n=12$), 观察在胆汁酸肠肝循环完整、胆汁体外引流及自体胆汁回输时 MMC 及血浆胃动素(MTL)浓度的变化。

结果: 正常狗小肠 MMC 有 3 个不同的时相; III 相时 MTL 水平较 I 相明显增高(433.8 ± 46.3 ng/L vs 112.6 ± 21.7 ng/L, $P=0.000<0.01$)。胆汁体外引流时, MMC 周期明显延长(110.2 ± 13.6 min vs 99.1 ± 14.4 min, $P=0.001<0.01$), 无 III 相活动, I 相缩短(31.0 ± 6.6 min vs 53.2 ± 9.2 min, $P=0.002<0.01$), II 相延长(79.2 ± 11.8 min vs 41.3 ± 9.9 min, $P=0.001<0.01$), II 相末 30 min 的动力指数较正常时降低(41.3 ± 6.8 mV/s vs 69.1 ± 9.2 mV/s vs, $P=0.001<0.01$); 而 MTL 在各监测点间无明显变化。自体胆汁回输后, 仍无明显的 MMC III 相活动, 与灌输前比较, MMC 周期缩短(101.9 ± 14.0 min vs 110.2 ± 13.6 min, $P=0.03<0.05$), I 相延长(44.1 ± 6.3 min vs 31.0 ± 6.6 min, $P=0.002<0.01$), II 相缩短(57.9 ± 10.7 min vs 79.2 ± 11.8 min, $P=0.002<0.01$), II 相末 30 min 的动力指数较引流前明显增高(59.4 ± 7.6 mV/s vs 41.3 ± 6.8 mV/s, $P=0.002<0.01$), 接近正常的 MMC 特征; 而血浆 MTL 水平仍无明显变化。

结论: 胆汁酸肠肝循环对维持 MMC 有重要意义, MTL 可能发挥着重要的中介作用。

张珍妮, 董蕾, 刘欣, 李毅. 胆汁酸肠肝循环对消化间期移行性复合运动的作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2610-2613

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2610.asp>

0 引言

在消化间期(禁食期)人和哺乳动物的胃肠道呈现一种独特的周期性的运动形式,称为移行性复合运动(MMC),表现为静息期与收缩期交替、规律性出现。MMC具有重要的生理功能,起着胃肠道“清道夫”的作用,可促进胃与幽门、小肠和胆道的协调性,并能防止肠道感染。胃动素(MTL)是一种重要的胃肠激素^[1-3],与MMC关系密切^[4-7]。有关MMC的研究国内外报道较多^[8-11],但其发生和调节机制还不清楚^[12-14],目前研究较多有争议的是胆汁酸的肠肝循环调节理论^[15-17]。我们通过建立狗胆汁酸体外循环模型,来观察胆汁酸肠肝循环对MMC的影响,并对血浆MTL浓度进行动态监测,以探讨MMC的发生和调节机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年犬12只,体质量15~20 kg,雌雄不限,由西安交通大学第二医院动物实验中心提供;RM6280C多道生理信号记录仪购自成都仪器厂;银丝电极购自上海市信息产业部电子23研究所特种线缆部;MTL放免试剂盒购自中国人民解放军总医院放免研究所;CCK放免试剂盒购自第二军医大学神经生物学教研室;NO试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法 实验犬硫酸钠股静脉麻醉后,无菌条件下右上腹旁正中切口打开腹腔,与胆总管十二指肠连接处上方2~3 cm处作一小切口,在两个断段各插一硅胶管,近端导管用以引流胆汁,远端导管用以回输自体胆汁。切断远近端硅胶管之间的胆总管以防胆流再通。随后,分别于胃窦、距幽门5 cm处十二指肠浆肌层缝置银丝电极,走皮下隧道引出体外。关腹后,用一连接硅胶管将2个引流硅胶管体外端连接起来,形成胆汁的体外循环,保证胆流通畅。将此硅胶管置于动物帆布背心中以防狗咬损坏。术后8 d进行第1次MMC的测定。实验前禁食12 min,实验时动物在清醒状态下悬挂于自制的测试台上,记录1个或1个以上完整的MMC周期后结束。同时在MMC I、II、III相通过静脉留置针各采集静脉血2 mL以检测血浆MTL浓度。之后去掉连接硅胶管,将近端引流硅胶管与一引流袋相连接,以收集胆汁,造成胆汁体外引流模型,引流袋置于动物帆布背心的小袋中以防狗咬损坏。术后第10 d再次进行测定,连续记录胃肠道运动3 h,观察胃肠MMC波形的变化,然后在MMC II相开始后10 min以1 mL/min的速率沿远端硅胶管注入狗自体胆汁10 min,再次记录胃肠道运动3 h。胆汁体外引流后在自体胆汁回输前后分别采血3次,每次2 mL,每次间隔1 h,以检测血浆MTL水平。测量MMC总体特征,MMC周期时间,MMC各时相时程,MMC III相的峰电频率与平均波幅以及动力指数^[18]等指标,采用放免法检测血浆MTL浓度。

统计学处理 数据以mean±SD表示,使用SPSS10.0统计软件,运用配对t检验对结果进行统计和分析。认

为 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 MMC运动 胆汁酸肠肝循环完整时,犬胃肠MMC周期为 99.1 ± 14.4 min,呈明显的3个时相,其中I相无收缩波,时程 53.2 ± 9.2 min; II相有间断收缩,时程 41.3 ± 9.9 min; III相出现强烈收缩,时程 4.9 ± 1.2 min(表1)。胃窦部位MMC III相峰电频率为 4.2 ± 1.5 次/min,十二指肠处为 9.5 ± 3.3 次/min,后者明显高于前者($P<0.01$)。胃窦部位MMC III相峰电波幅为 2.0 ± 0.3 mV,十二指肠部位MMC III相峰电波幅平均为 1.4 ± 0.2 mV,前者明显高于后者($P<0.01$,图1)。

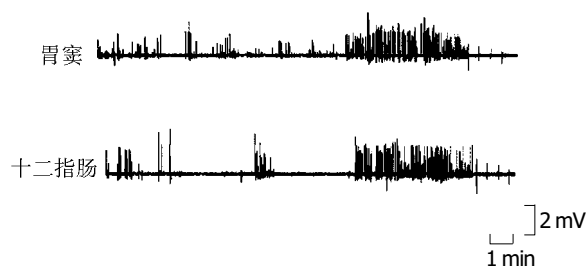


图1 正常犬消化间期MMC II相和III相。

胆汁体外引流后,未记录到MMC III相活动,与正常MMC相比,MMC周期明显延长($P<0.01$),主要表现为II相延长($P<0.01$),I相缩短($P<0.01$),II相末30 min动力指数较正常时降低($P<0.01$,图2,表1)。

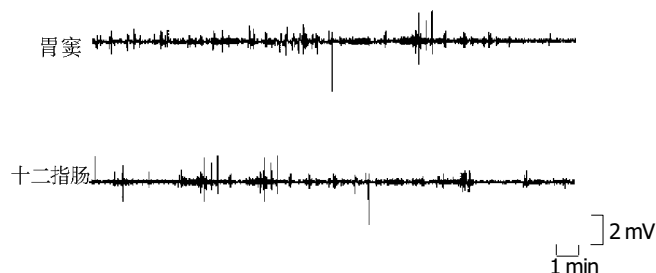


图2 胆汁体外引流时犬消化间期MMC活动,以II相为主。

表1 犬正常、胆汁引流、胆汁回输时的MMC特征(mean±SD, n=12)

	MMC周期(min)	I相时程(min)	II相时程(min)	相末30 min动力指数(mV/s)
正常	99.1 ± 14.4	53.2 ± 9.2	41.3 ± 9.9	69.1 ± 9.2
胆汁引流	110.2 ± 13.6 ^b	31.0 ± 6.6 ^b	79.2 ± 11.8 ^b	41.3 ± 6.8 ^b
胆汁回输	101.9 ± 14.0 ^c	44.1 ± 6.3 ^{ad}	57.9 ± 10.7 ^{bd}	59.4 ± 7.6 ^{ad}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 正常; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 胆汁引流。

胆汁体外引流自体胆汁回输后,仍未记录到MMC III相活动,但与自体胆汁回输前相比较,MMC周期缩短($P<0.05$),主要表现为II相缩短($P<0.01$),I相延长($P<0.01$),II相末30 min动力指数较引流前明显

增高($P < 0.01$, 表 1).

2.2 血浆 MTL 水平 胆汁酸肠肝循环完整时, 血浆 MTL 水平随 MMC 发生周期性波动, 血浆 MTL 浓度在 MMC I, II, III 相分别为 112.6 ± 21.7 , 215.0 ± 34.4 , 433.8 ± 46.3 ng/L, MMC III 相时血浆 MTL 水平明显高于 MMC I, II 相($P < 0.01$), 而 MMC II 相时 MTL 水平明显高于 I 相($P < 0.01$, 图 3).

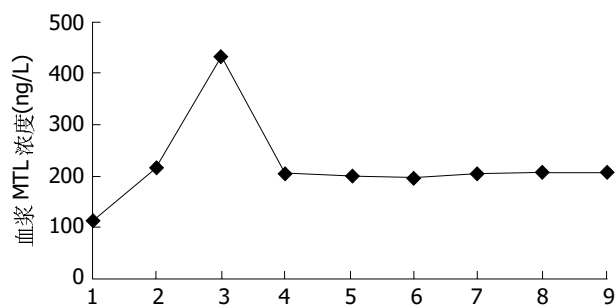


图3 正常 MMC I, II, III 相, 胆汁引流及自体胆汁回输时的血浆 MTL 浓度. 1, 2, 3: 正常 MMC I, II, III 相; 4-9: 胆汁引流时自体胆汁回输前 2 h, 1 h, 回输点, 回输后 1 h, 2 h 和 3 h.

胆汁体外引流后血浆 MTL 水平在各监测点间无明显差异($P > 0.05$), 平均值为 201.0 ± 21.0 ng/L, 比胆汁体外引流前 I 相 MTL 水平增高($P < 0.01$), 而低于引流前 III 相 MTL 水平($P < 0.01$, 图 3). 胆汁体外引流自体胆汁回输后, 各检测点之间血浆 MTL 水平无明显差异($P > 0.05$), 平均值为 206.1 ± 21.4 ng/L, 与自体胆汁灌输前相比较稍有增高, 但无显著性差异($P > 0.05$, 图 3).

3 讨论

关于 MMC 的研究最早开始于 20 世纪初, 至今已经经历了 100 a 的历史. MMC 的发生及调节机制比较复杂, 可能有多种因素参与, 但其具体机制尚未完全阐明. 胆汁酸的肠肝循环调节理论越来越引起人们的重视. 胆汁酸是胆汁的主要成分, 约占胆汁中固体成分的 85%. 肝脏分泌的胆汁酸大部分储存在胆囊, 在消化间期, 胆汁酸随胆囊收缩呈周期性排出. 胆汁酸随胆汁通过胆道进入十二指肠后, 绝大部分(约 95%)由小肠黏膜重吸收入血, 通过门静脉返回肝脏. 经过肝细胞加工转化后, 连同新合成的胆汁酸一起又分泌入小肠, 绝大部分又被重吸收入血回肝. 胆汁酸如此在肠和肝之间循环往复的过程, 称为胆汁酸的肠肝循环.

有关胆汁酸肠肝循环对 MMC 的作用及其机制的研究目前还存在很多争论. 部分研究者认为胆汁酸的肠肝循环在胃肠道 MMC 的启动及调节方面发挥着至关重要的作用, 若胆汁酸的肠肝循环被破坏, 则胃肠道 MMC 的周期性运动消失^[19-22], 并认为 MTL 在此过程中发挥着桥梁作用^[23-26]; 另有部分学者则认为胆汁酸的肠肝循环和血浆 MTL 浓度的周期性波动对胃肠道 MMC 的启动和调节没有特殊作用, 肠肝循环的破坏不能改变 MMC

的周期性运动, 他们仅仅可能只是胃肠 MMC 周期性运动产生的一个结果^[27-28]. 我们发现, 在正常状态下, 消化间期胃肠 MMC 呈现明显的规律性运动, 表现为静止期和收缩期交替出现. 一个完整的 MMC 周期包括波幅和持续时间明显不同的 3 个连续的时相. 当胆汁酸的肠肝循环被破坏后, 小肠原有的 MMC 特征发生了明显的改变, MMC III 相消失, 同时, 血浆 MTL 水平的周期性波动消失, 保持在一个较为平稳的状态. 因此我们认为维持胆汁酸肠肝循环的完整性对于小肠 MMC 具有重要意义. 这种现象发生的机制目前还不清楚, 可能与神经、激素调节以及肠内内容物的生化成分对肠道平滑肌的作用有关, 但是我们可以肯定的是 MTL 在此过程中发挥着不容忽视的作用, 他是调节 MMC 的一种重要的胃肠激素. 但是也有很多的研究报道不同于我们实验所得到的结果, 分析原因可能是由于他们所使用的胆汁体外引流的方法不能保证完全阻断了胆流, 而且不能避免发生了胆总管自发性再通的可能性. 我们的实验在设计时避免了这方面的因素, 胆总管插管的同时被横断以保证胆流完全阻断.

有关胆汁酸回输对胃肠 MMC 的影响的研究, 目前亦无定论. 有学者认为胆汁回输可以诱发十二指肠 MMC^[20-21, 29]; 而 Scott *et al*^[27]认为胆汁回输对胃肠 MMC 的特征和起源位点没有影响, Luiking *et al*^[30]研究发现健康人十二指肠内合成胆汁灌注对 MMC 也没有影响; 另有理论认为胆汁酸对 MMC 非但没有启动和调节作用, 相反, 胆汁排入十二指肠可以破坏胃肠 MMC^[31]. 我们在胆汁体外引流期间将狗自体胆汁回输入十二指肠并不能恢复正常 MMC 的特征, 也不能恢复血浆 MTL 的周期性波动, 但是与自体胆汁回输前相比较, 胆汁回输后的十二指肠 MMC 更为接近正常的 MMC. 因此, 我们不能否认胆汁酸肠肝循环对 MMC 的重要性. 那么, 为什么自体胆汁回输后不能恢复正常的 MMC 呢? 分析其原因, 可能有以下几种: 我们所采用的胆汁回输方式, 并没有恢复正常的胆汁酸的肠肝循环. 我们以 1 mL/min 的速率回输自体胆汁 10 min, 此量接近于狗正常体内胆汁酸池的 40%^[27, 32], 由于胆汁引流期间, 肠道内的胆汁酸已经被完全代谢和排泄, 缺乏了正常肠道内胆汁酸浓度的铺垫, 10 mL 的胆汁回输或许并没有达到胆汁酸发挥其作用的生理浓度, 所以不能诱发正常的十二指肠 MMC III 相. 我们同时观察到胆汁酸回输后改变了胃肠 MMC 的特征, 使其更为接近正常 MMC 的特征, 所以我们认为胆汁酸对胃肠 MMC 的作用是肯定的, 只是存在一个从量变到质变的问题; 我们所采用的回输方式有别于 Ozeki *et al*^[20], 他们采用的是长时间 (6 h) 连续灌输胆汁, 或许在胆汁引流的情况下, 这种方式的灌输更有利于胆汁酸发挥作用; 记录时间不足. Ozeki *et al*^[20]观察到胆汁回输后需要 2 h 左右来诱发十二指肠 MMC, 而 Kajiyama *et al*^[33]报道将熊去氧胆酸注入静脉来诱发十二指肠 MMC 所需要的时间为 4-8 h. 因

为实验条件所限制, 我们在狗自体胆汁回输后对其胃肠 MMC 监测了 3 h, 这或许也是我们没有记录到胆汁酸所诱发的 MMC III 相的一个原因。

4 参考文献

- Luiking YC, Akkermans LM, Peeters TL, Cnossen PJ, Nieuwenhuijs VB, Vanberge-Henegouwen GP. Effects of motilin on human interdigestive gastrointestinal and gallbladder motility, and involvement of 5HT₃ receptors. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14:151-159
- Qvist N, Oster-Jorgensen E, Pedersen SA, Rasmussen L, Hovendal C, Holst JJ. Increases in plasma motilin follow each episode of gallbladder emptying during the interdigestive period, and changes in serum bile acid concentration correlate to plasma motilin. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:122-127
- Stolk MF, van Erpecum KJ, Smout AJ, Akkermans LM, Jansen JB, Lamers CB, Peeters TL, vanBerge-Henegouwen GP. Motor cycles with phase III in antrum are associated with high motilin levels and prolonged gallbladder emptying. *Am J Physiol* 1993; 264(4 Pt 1):G596-600
- 易受乡, 林亚平, 严洁, 常小荣, 杨昱. 电针对大鼠胃运动、P 物质和胃动素的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:284-287
- 杨春敏, 王建荣, 张秀荣, 张映辉, 毛高平. 游泳对大鼠胃肠动力及血浆胃动素的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:586-587
- 刘维新, 洪光, 傅宝玉, 姜若兰, 刘峥艳. 功能性消化不良患者消化间期血浆胃动素水平及胃十二指肠动力的改变. *世界华人消化杂志* 2001;9:722-724
- 任平, 黄熙, 张莉, 王骊丽, 李月彩, 陈建宗. 脾虚大鼠 IMC-胃肠运动-Mot 间的关系. *世界华人消化杂志* 2000;8:516-519
- Thomas EA, Sjoval H, Bornstein JC. Computational model of the migrating motor complex of the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G564-572
- Spencer NJ, Bywater RA. Enteric nerve stimulation evokes a premature colonic migrating motor complex in mouse. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14:657-665
- Powell AK, O'Brien SD, Fida R, Bywater RA. Neural integrity is essential for the propagation of colonic migrating motor complexes in the mouse. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14: 495-504
- Andrews JM, O'donovan DG, Hebbard GS, Malbert CH, Doran SM, Dent J. Human duodenal phase III migrating motor complex activity is predominantly antegrade, as revealed by high-resolution manometry and colour pressure plots. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14:331-338
- Tanaka T, VanKlompberg LH, Sarr MG. Selective role of vagal and nonvagal innervation in initiation and coordination of gastric and small bowel patterns of interdigestive and postprandial motility. *J Gastrointest Surg* 2001;5:418-433
- Wang L, Zhou L, Tian R. Role of the area postrema of medulla oblongata in the regulation of canine interdigestive migrating motor complex. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:384-388
- Friis ML, Johansen B, Djurhuus JC, Gregersen H. Distension-induced duodenal contractions vary with the phases of the canine interdigestive migrating motility complex. *Int J Surg Investig* 1999;1:39-45
- Plaza MA. 5-hydroxytryptamine and the gastrointestinal migrating motor complex. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2:539-544
- Tanaka T, Kendrick ML, Zyromski NJ, Meile T, Sarr MG. Vagal innervation modulates motor pattern but not initiation of canine gastric migrating motor complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G283-292
- Stolk MF, Van Erpecum KJ, Peeters TL, Samsom M, Smout AJ, Akkermans LM, Vanberge-Henegouwen GP. Interdigestive gallbladder emptying, antroduodenal motility, and motilin release patterns are altered in cholesterol gallstone patients. *Dig Dis Sci* 2001;46:1328-1334
- Simren M, Castedal M, Svedlund J, Abrahamsson H, Bjornsson E. Abnormal propagation pattern of duodenal pressure waves in the irritable bowel syndrome (IBS) [correction of (IBD)]. *Dig Dis Sci* 2000;45:2151-2161
- Scott RB, Strasberg SM, El-Sharkawy TY, Diamant NE. Regulation of the fasting enterohepatic circulation of bile acids by the migrating myoelectric complex in dogs. *J Clin Invest* 1983; 71:644-654
- Ozeki K, Sarna SK, Condon RE, Chey WY, Koch TR. Enterohepatic circulation is essential for regular cycling of duodenal migrating motor complexes in dogs. *Gastroenterology* 1992; 103:759-767
- Owyang C, Funakoshi A, Vinik AI. Evidence for modulation of motilin secretion by pancreatico-biliary juice in health and in chronic pancreatitis. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:1015-1020
- Malfertheiner P, Sarr MG, DiMagno EP. Role of the pancreas in the control of interdigestive gastrointestinal motility. *Gastroenterology* 1989;96:200-205
- Hellstrom PM, Nilsson I, Svenberg T. Role of bile in regulation of gut motility. *J Intern Med* 1995;237:395-402
- Nieuwenhuijs VB, Luiking YC, Verheem A, vanBerge-Henegouwen GP, Gooszen HG, Akkermans LM. Disrupted bile flow affects interdigestive small bowel motility in rats. *Surgery* 1997;122:600-608
- Portincasa P, Peeters TL, van Berge-Henegouwen GP, van Solinge WW, Palasciano G, van Erpecum KJ. Acute intraduodenal bile salt depletion leads to strong gallbladder contraction, altered antroduodenal motility and high plasma motilin levels in humans. *Neurogastroenterol Motil* 2000;12: 421-430
- Yang M, Fang DC, Li QW, Sun NX, Long QL, Sui JF, Gan L. Effect of gastric pacing on gastric emptying and plasma motilin. *World J Gastroenterol* 2004;10:419-423
- Scott RB. Effect of duodenal bile acid delivery on fasting intestinal motor activity. *Am J Physiol* 1986;250(6 Pt 1):G836-841
- Hughes SJ, Behrns KE, Sarr MG. Chronic bile diversion does not alter canine interdigestive myoelectric activity. *Dig Dis Sci* 1993;38:1055-1061
- Van Ooteghem NA, Van Erpecum KJ, Van Berge-Henegouwen GP. Effects of ileal bile salts on fasting small intestinal and gallbladder motility. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14:527-533
- Luiking YC, Kloppers NJ, Roelofs JM, Nieuwenhuijs VB, Peeters TL, Akkermans LM, van Berge Henegouwen GP. Effects of intraduodenal bile on interdigestive gastrointestinal and gallbladder motility in healthy subjects. *Digestion* 2001; 63:195-202
- Kruis W, Haddad A, Phillips SF. Chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids alter motility and fluid transit in the canine ileum. *Digestion* 1986;34:185-195
- Small DM, Dowling RH, Redinger RN. The enterohepatic circulation of bile salts. *Arch Intern Med* 1972;130:552-573
- Kajiyama Y, Irie M, Enjoji A, Ozeki K, Ura K, Kanematsu T. Role of bile acids in duodenal migrating motor complexes in dogs. *Dig Dis Sci* 1998;43:2278-2283

外源质粒DNA经胃肠道途径对小鼠免疫功能的影响

刘建文, 施用晖, 乐国伟

刘建文, 施用晖, 乐国伟, 江南大学食品营养与安全研究所, 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏省无锡市 214036
刘建文, 男, 1977-04-28 生, 福建仙游人, 汉族, 分子营养学博士研究生, 主要从事分子营养与代谢调控研究。
国家自然科学基金资助项目, No.30270970
项目负责人: 乐国伟, 214036, 江苏省无锡市惠河路 170 号, 江南大学营养与生物技术教研室, 江南大学工业生物技术教育部重点实验室. lgw@sytu.edu.cn
电话: 0510-5869236 传真: 0510-5869236
收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-09-19

Effect of oral administration of foreign plasmid DNA on immune function in mice

Jian-Wen Liu, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le

Jian-Wen Liu, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le, Institute of Food Nutrition and Safety, Department of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30270970
Correspondence to: Dr. Guo-Wei Le, Department of Nutrition and Biotechnology, Southern Yangtze University, 170 Huihe Road, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China. lgw@sytu.edu.cn
Received: 2004-07-20 Accepted: 2004-09-19

Abstract

AIM: To investigate the effect of foreign plasmid DNA on immune function in mice through oral administration.

METHODS: After oral administration of foreign plasmid pcDNA3, thymus and spleen index, anti-sheep red blood cell (SRBC), number of antibody secreting cell (NASC) in spleen and phagocytic activity were detected. Lymphocytic transformation rate (LTR) in spleen was determined using MTT methods. Serum IgA, IgG and IgM in immune suppression mice were also examined with immunoglobulin kit.

RESULTS: Thymus and spleen index, LTR, anti-SRBC and NASC in spleen significantly increased after administration of foreign plasmid pcDNA3 (3.53 ± 0.80 vs 5.10 ± 0.47 mg/g, $P < 0.05$; 5.69 ± 0.92 vs 7.49 ± 1.18 mg/g, $P < 0.05$; 1.047 ± 0.012 vs 1.154 ± 0.016 , $P < 0.05$; 6.46 ± 0.12 vs 8.18 ± 0.29 , $P < 0.05$; 0.403 ± 0.008 vs 0.471 ± 0.007 , $P < 0.05$; respectively). Phagocytic activity also increased significantly (phagocytic index: 0.53 ± 0.017 vs 0.72 ± 0.029 , $P < 0.01$); (phagocytic ratio: 32.30 ± 1.098 vs 60.53 ± 2.022 , $P < 0.01$). The serum IgA, IgG and IgM of immune suppression mice resumed to normal level.

CONCLUSION: Foreign plasmid DNA can induce humoral and cell mediated immune in mice after administration via the gastrointestinal tract.

Liu JW, Shi YH, Le GW. Effect of oral administration of foreign plasmid DNA on immune function in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2614-2617

摘要

目的: 研究外源质粒DNA经胃肠道吸收后对小鼠免疫功能的影响。

方法: 观察外源质粒 pcDNA3 对小鼠胸腺、脾脏指数, 脾脏淋巴细胞转化率, 脾脏抗体细胞生成含量, 血清溶血素水平, 巨噬细胞吞噬指数及吞噬率的影响, 并考察了外源质粒 pcDNA3 对免疫低下小鼠血清 IgA、IgG 及 IgM 的影响。

结果: 外源质粒 pcDNA3 经胃肠道摄入后能够提高胸腺指数 (3.53 ± 0.80 vs 5.10 ± 0.47 mg/g, $P < 0.05$)、脾脏指数 (5.69 ± 0.92 vs 7.49 ± 1.18 mg/g, $P < 0.05$)、脾脏淋巴细胞转化率 (1.047 ± 0.012 vs 1.154 ± 0.016 , $P < 0.05$)、脾脏抗体细胞生成含量 (0.403 ± 0.008 vs 0.471 ± 0.007 , $P < 0.05$)、血清溶血素水平 (6.46 ± 0.12 vs 8.18 ± 0.29 , $P < 0.05$)、巨噬细胞吞噬指数 (0.53 ± 0.017 vs 0.72 ± 0.029 , $P < 0.01$) 及吞噬率 (32.30 ± 1.098 vs 60.53 ± 2.022 , $P < 0.01$), 并且能够恢复免疫低下小鼠血清 IgA、IgG 及 IgM 的水平。

结论: 外源质粒DNA经胃肠道途径摄入后能够诱导小鼠广泛的体液免疫和细胞免疫应答。

刘建文, 施用晖, 乐国伟. 外源质粒 DNA 经胃肠道途径对小鼠免疫功能的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2614-2617

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2614.asp>

0 引言

长期以来人们一直把 DNA 作为一种遗传物质, 将其与免疫活性联系起来只是近 20 年的事情. 细菌 DNA 不仅可以诱发抗体, 还能调节小鼠 B 细胞和 T 细胞的功能, 并刺激巨噬细胞产生细胞因子, 增强机体天然免疫^[1]. 外源质粒 pcDNA3 作为 DNA 疫苗的典型载体, 其质粒骨架上含有非甲基化的 CpG 序列, 非甲基化的 CpG 序列具有免疫刺激作用, 能够促进多种免疫细胞活化, 诱导细胞因子的产生, 使机体产生快速高水平的抗体应答及细胞免疫应答^[2-14]. 外源质粒 DNA 进入肠道后直接激活肠道抗原递呈细胞特异性递呈抗原到 T 和 B 淋巴细胞上, 诱导抗原特异性免疫应答. 一部分外源质粒 DNA 可以穿透肠黏膜被组织中的免疫细胞所识别并激活免疫应答. 我们口服给药, 研究外源质粒 DNA 通过肠黏膜吸收对机体产生免疫应答的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 昆明种小鼠, δ , 体质量 20 ± 2 g, 由江

苏省实验动物中心提供. 质粒 pcDNA3 与含有 pcDNA3 的大肠杆菌 DH5 α 由本室保存. 大量摇瓶发酵 5 L 含有 pcDNA3 的 *E.coli* DH5 α , 碱裂解法提取, 聚乙二醇纯化, Triton X-114 去除内毒素, 检测质粒样品 260/280>1.8, 同时进行 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳确保 DNA 的完整性并无 RNA^[15]. RPMI1640 培养基、小牛血清、MTT、谷氨酰胺和 ConA 均购自上海华美生物工程公司, 绵羊红细胞(SRBC)购自无锡市汇生试剂有限公司, 豚鼠血清自制. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法 健康昆明种小鼠 40 只, δ , 随机分成 4 组, 1 组 pcDNA3 溶液 1 g/L, 200 μ L; 2 组 pcDNA3 溶液 0.1 g/L, 200 μ L; 3 组 calf thymus DNA 1 g/L, 200 μ L; 4 组生理盐水溶液 200 μ L. DNA 样品临用前用生理盐水溶液溶解.

1.2.1 实验 1 前 3 d 连续给小鼠灌胃 3 d, 实验 10 d 眼球采血处死. 称取体质量, 无菌取脾脏、胸腺, 称质量, 分别计算脏器指数 = 脏器质量(g)/体质量(g). (1)脾脏淋巴细胞转化率(SI)测定采用 MTT 比色法^[16]. 无菌分离小鼠脾脏, 放在盛有 PBS 液的培养皿中, 按常规方法分离脾脏淋巴细胞, 最后将细胞重悬于 RPMI1640 完全培养基中, 并将细胞浓度调成 2×10^6 /L. 在 96 孔板中加入细胞悬液 200 μ L, 每个样品设 3 个阳性孔, 3 个阴性对照孔, 阳性孔中加入 10 mg/L 的 ConA, 对照孔不加 ConA. 在 37 $^{\circ}$ C, 5 mg/L CO₂ 的培养箱中培养 72 h, 结束培养前 4 h, 每孔吸弃上清 100 μ L, 加入 5 g/L 的 MTT 10 μ L, 继续培养至结束. 测定前每孔加入 DMSO 150 μ L 溶解甲肼沉淀, 于酶联免疫检测仪上 570 nm 处测定吸光度. 淋巴细胞转化率(SI) = A 阳性/A 阴性. (2)小鼠 PM Φ 吞噬实验 小鼠 ip 无菌 PBS 2 mL, 轻揉腹部 3~5 min 后, 用注射器抽取腹腔液少许, 滴加于干净载玻片上, 每片 2~3 滴. 将玻片放于平皿中, 盖好皿盖, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 使巨噬细胞贴壁. 取出玻片, 用生理盐水轻轻洗去非贴壁细胞. 每张玻片加酵母悬液 2 滴, 将玻片置平皿内, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 30~40 min. 取出玻片, 用生理盐水轻轻洗去未被吞噬的酵母菌. 用 10 g/L 戊二醛固定 2~3 min, 再用生理盐水冲洗、风干, 用美蓝染色液染色 1~2 min, 冲洗, 待干. 油镜观察巨噬细胞吞噬酵母菌的现象. 统计 100 个巨噬细胞中有多少个吞噬了酵母菌, 将吞噬酵母菌的巨噬细胞数除以 100, 即为吞噬率. 再统计 100 个巨噬细胞中一共吞噬了多少个酵母菌, 将被吞噬的酵母菌总数除以 100, 得出每个巨噬细胞吞噬酵母菌的平均数, 即为吞噬指数^[17].

1.2.2 实验 2 前 3 d 连续给小鼠灌胃 3 d, 实验 6 d 所有小鼠均 ip 100 mL/L 绵羊红细胞 0.2 mL (约 4 亿个), 10 d 摘眼球取血, 37 $^{\circ}$ C 水浴使血液凝固, 2 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 无菌分离脾脏. (1)抗体生成细胞含量(number of antibody secreting cell, NASC) SRBC 定量溶血分光光度测定法. 取脾细胞密度为 5×10^6 /L 的悬液, 2 g/L SRBC 和 100 mL/L 豚鼠血清补体各 0.5 mL, 混匀

后于 37 $^{\circ}$ C 的水浴锅中保温 1 h. 然后 3 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清. 另设不加补体的细胞悬液作为空白, 处理方法同上. 于 413 nm 处以空白调零, 测定上清的吸光值. 以吸光度表示抗体生成细胞含量. (2)血清中抗 SRBC 特异性抗体(溶血素)测定, 参照文献[18]. 取经生理盐水稀释的小鼠血清样品 50 μ L (稀释 20 倍), 加入 0.5 mL, 50 mL/L 绵羊红细胞置于冰水浴中冷却, 并于每管中加入补体 1 mL (以 PBS 按 1:10 稀释的豚鼠血清, 自制), 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 min. 冰水浴中止反应. 1 500 r/min 离心 5 min, 取上清 1 mL, 加入都氏试剂 3 mL, 置于试管内充分摇匀, 放置 10 min 后, 由于溶血产生的全部血红蛋白变成氰化血红蛋白, 呈稳定的红色, 于 540 nm 测定吸光度. 以生理盐水 1 mL 代替血清样品作为样品空白. 取 0.25 mL 试验用的, 经过洗涤和稀释的 SRBC, 用都氏试剂稀释至 4 mL, 摇匀, 放置 10 min, 540 nm 比色, 该值即为试验中所用 SRBC 半数溶血时的吸光度值. 样品 HC₅₀ = (样品 A 值/SRBC 半数溶血时 A 值) \times 稀释倍数.

1.2.3 健康昆明种小鼠 40 只, δ , 随机分成 4 组, 1 组实验前 1 d 预先注射环磷酰胺(150 mg/kg)1 次, 实验前 3 d 分别每天给小鼠灌胃 pcDNA3 溶液(1 g/L)200 μ L/次; 2 组实验前 1 d 预先注射环磷酰胺(150 mg/kg)1 次, 实验前 3 d 分别每天给小鼠灌胃 pcDNA3 溶液(0.1 g/L)200 μ L/次; 3 组实验前 1 d 预先注射环磷酰胺(150 mg/kg)1 次, 实验前 3 d 分别每天给小鼠灌胃生理盐水溶液 200 μ L/次; 4 组实验前 1 d 预先注射生理盐水溶液 1 次, 实验前 3 d 分别每天给小鼠灌胃生理盐水溶液 200 μ L/次; 实验 10 d 眼球采血分离血清. 小鼠血清 IgA、IgG、IgM 等 3 种免疫球蛋白水平的测定, 11 pcDNA3(1 g/L, 200 μ L) + 环磷酰胺(150 mg/kg); 2 pcDNA3(0.1 g/L, 200 μ L) + 环磷酰胺(150 mg/kg); 3 环磷酰胺(150 mg/kg); 4 Saline Solution. 免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 水平测定采用温州医学院免疫球蛋白试剂盒.

统计学处理 结果采用 SPSS 软件进行方差分析.

2 结果

2.1 小鼠脏器指数及脾淋巴细胞转化率 添加质粒 pcDNA3 能够提高小鼠的胸腺指数和脾脏指数, 其中灌胃 0.1 g/L pcDNA3 组的小鼠胸腺指数和脾脏指数均显著增加($P < 0.05$, 表 1), 小牛胸腺 DNA 组小鼠的胸腺指数也略有增加, 但差异不显著. 灌胃质粒 pcDNA3 溶液的脾淋巴细胞转化率均高于对照组与小牛胸腺 DNA 组($P < 0.05$). 临床上通常用淋巴细胞的转化率来评价机体的免疫状况. 结果表明灌胃外源质粒 pcDNA3 溶液可显著($P < 0.05$)提高小鼠脾淋巴细胞的转化率, 促进淋巴细胞的转化, 是脾淋巴细胞的丝裂原.

2.2 腹腔巨噬细胞吞噬功能 灌胃质粒 pcDNA3 溶液的两组小鼠的腹腔巨噬细胞吞噬率及吞噬指数均显著高于对照组($P < 0.01$, 表 1), 显微镜下观察 1 组和 2 组 PM Φ

表1 外源质粒 pcDNA3 对小鼠脏器指数、脾淋巴细胞转化率及腹腔巨噬细胞的影响

分组	Thymus (mg/g)	Spleen (mg/g)	脾淋巴细胞转化率(SI)	吞噬率	吞噬指数
pcDNA3 1 g/L	3.81 ± 0.19	5.77 ± 0.78	1.261 ± 0.004 ^a	64.28 ± 3.207 ^{bd}	0.84 ± 0.032 ^{bd}
pcDNA3 0.1 g/L	5.10 ± 0.47 ^a	7.49 ± 1.18 ^a	1.154 ± 0.016 ^a	60.53 ± 2.022 ^{bd}	0.72 ± 0.029 ^{bd}
Calf thymus DNA 1 g/L	4.18 ± 0.29 ^a	5.46 ± 0.59	1.067 ± 0.009	34.68 ± 1.031	0.58 ± 0.016
4. Normal Saline	3.53 ± 0.80	5.69 ± 0.92	1.047 ± 0.012	32.30 ± 1.098	0.53 ± 0.017

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs Normal Saline; ^d*P* < 0.01 vs Calf thymus DNA.

体积明显增大, 表面突起而伸展. 这表明通过胃肠道途径灌胃质粒 pcDNA3 溶液, 可激活 PM Φ , 促进 PM 的吞噬功能, 从而提高机体的免疫功能. 而第3组小牛胸腺 DNA 与对照组相比则差异不显著, 提示小牛胸腺 DNA 为真核 DNA, 真核 DNA 上的 CpG 基序主要以甲基化形式存在, 无免疫刺激活性.

2.3 抗体生成细胞含量、溶血素及免疫球蛋白 灌胃 pcDNA3 质粒组的抗体生成细胞数量及溶血素水平均有升高的趋势, 其中灌胃 0.1 g/L pcDNA3 质粒组的血清溶血素水平明显高于对照组 (*P* < 0.05, 表2), 而小牛胸腺 DNA 组与对照组相比, 抗体生成细胞数量和溶血素水平均无增加的趋势(表2). 注射环磷酰胺小鼠血清免疫球蛋白水平明显低于正常对照组 (*P* < 0.05, 表3), 灌胃质粒 pcDNA3 溶液后, 小鼠血清 IgA、IgG 及 IgM 水平均高于免疫低下组 (*P* < 0.05, 表3), 且 1 g/L pcDNA3 组的三种免疫球蛋白水平均恢复到正常水平, 说明外源质粒 DNA 具有拮抗环磷酰胺致免疫低下的作用.

2.4 免疫球蛋白

表2 外源质粒 pDNA3 对抗体生成细胞数量与溶血素水平的影响

分组	NASC	Anti-SRBC
pcDNA3 1 g/L	0.431 ± 0.002	6.59 ± 0.11
pcDNA30.1 g/L	0.471 ± 0.007 ^a	8.18 ± 0.29 ^a
Calf thymus DNA 1 g/L	0.407 ± 0.004	5.52 ± 0.12
Normal Saline	0.403 ± 0.008	6.46 ± 0.12

^a*P* < 0.05 vs Normal Saline.

表3 外源质粒 pDNA3 对环磷酰胺致免疫低下小鼠血清 IgA、IgG 及 IgM 水平的影响

分组	IgA(g/L)	IgG(g/L)	IgM(g/L)
1 g/L, pcDNA3+ 环磷酰胺	1.29 ± 0.12 ^a	13.01 ± 3.42 ^a	1.17 ± 0.29 ^a
0.1 g/L, pcDNA3+ 环磷酰胺	0.77 ± 0.11	10.12 ± 2.16 ^a	1.04 ± 0.25 ^a
环磷酰胺	0.69 ± 0.16 ^c	7.74 ± 1.13 ^c	0.88 ± 0.08 ^c
Normal Saline	1.16 ± 0.45	12.11 ± 3.61	1.07 ± 0.62

^a*P* < 0.05 vs 环磷酰胺; ^c*P* < 0.05 vs Normal Saline.

3 讨论

细菌 DNA 本身就是一种免疫佐剂, 可有效地激活多种

免疫效应细胞, 并刺激其分泌活性因子. 介导这一作用的是一类短核苷酸序列, 称为 ISS. 这些序列绝大部分是由非甲基化的胞嘧啶核苷酸和鸟嘌呤核苷酸(CpG)为基序(motif)的寡聚体构成, 故又称 CpG DNA. CpG DNA 可促进在体内建立 Th1 型占优势的免疫应答, 诱导 IL-12, IFN- γ 等细胞因子的产生^[19-22]. 5' -AACGTT-3' 是一种具有较强活性的 ISS, 在氨苄青霉素抗性基因(ampR)中含有他的两个拷贝. Johansson *et al*^[23]发现注射质粒 pcDNA3 能够诱导细胞因子 IFN- α 的释放, pcDNA3 作为一种 DNA 疫苗载体, 本身具有免疫刺激活性, 其免疫刺激活性与 pcDNA3 载体上的非甲基化的 CpG 基序有关. 与正常组小鼠相比, 给小鼠灌胃 pcDNA3, 小鼠胸腺指数、脾脏指数、脾脏淋巴细胞转化率、腹腔巨噬细胞吞噬功能、脾脏抗体形成细胞数量、血清中抗 SRBC 特异性抗体水平均有所升高; 而灌胃小牛胸腺 DNA 组小鼠体增重、脾脏指数、血清中抗 SRBC 是特异性抗体水平等与对照组相比差异不显著. 值得关注的是灌胃低剂量 pcDNA3 组小鼠胸腺指数、脾脏指数、抗体生成细胞数及血清溶血素水平均较其他组高, 差异显著 (*P* < 0.05). 灌胃 0.1 g/L 质粒 pcDNA3 对小鼠产生的免疫应答显著高于灌胃 1 g/L 质粒实验组. 高剂量灌胃给药可能引起小鼠产生免疫耐受, 从而是使免疫应答水平反而比低剂量低. 提示外源质粒 DNA 的免疫刺激作用具有一定的剂量依赖性. 实验还发现质粒 DNA 对环磷酰胺致免疫低下小鼠的免疫功能具有恢复作用.

我们发现小牛胸腺 DNA(甲基化 DNA)经胃肠道途径吸收对小鼠基本上无免疫刺激作用. 提示对小鼠免疫系统产生刺激作用的是非甲基化 DNA(如细菌 DNA、细菌质粒等), 而甲基化 DNA(如脊椎动物 DNA)则无此作用. Johansson *et al*^[23]也发现将 pcDNA3 上的 CpG 基序甲基化后, 则失去免疫刺激活性. 一般认为细菌 DNA 具有免疫刺激活性是因为细菌基因组中含有大量的非甲基化的 CpG motif, 而脊椎动物基因组中 CpG motif 的含量较少, 仅为细菌的 1/4, 且 80% 以上为甲基化修饰, 因此不具有免疫刺激活性. 研究发现 CpG motif 中 dC 的第 5 位碳原子是否发生甲基化对其活性的影响非常重要, 将人工合成的 CpG-ODN 进行甲基化处理后, 免疫活性消失, 说明非甲基化的 CpG motif 是引起机体免疫应答的关键因素. 但对于哺乳动物来源的 DNA, 即使将其

去甲基化处理依然不能引起机体免疫应答。

以往的研究中表明外源质粒 DNA 经胃肠道摄入后, 能够在肠道中不完全降解, 以碎片的形式广泛分布于全身各个组织中^[24-25]。外源 DNA 经胃肠道吸收代谢及其对机体产生的影响并未引起人们的高度关注, 主要原因在于人们往往认为外源 DNA (包括食品中的 DNA) 大部分在肠道中被降解, 作为核酸疫苗用 DNA 则主要采取肌肉注射或基因枪方式, 口服递呈抗原往往效价太低, 一直不被人们所重视。Shimosato *et al*^[26]发现肠道中存在 TLR-9 (Toll-like receptor-9) 受体。CpG-ODN 刺激免疫细胞的作用机制主要是通过 TLR9 受体发挥作用的。TLR9 主要表达于 DC 细胞、B 细胞、NK 细胞、T 细胞等, 可以识别 CpG-ODN 并与之结合, 激发细胞氧化还原平衡的改变, 通过 MyD-88, IRAK, TRAF-8 诱发细胞信号通路包括 MAPK 和 NF- κ B, 引起细胞活化, 启动固有性免疫应答^[27-34]。

4 参考文献

- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-760
- Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 2004;4:249-258
- Klinman DM. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immunoprotective agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:937-946
- Ishii KJ, Gursel I, Gursel M, Klinman DM. Immunotherapeutic utility of stimulatory and suppressive oligodeoxynucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 2004;6:166-174
- Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Zeng X, Krieg AM, Standiford TJ. CpG oligodeoxynucleotides stimulate protective innate immunity against pulmonary *Klebsiella* infection. *J Immunol* 2004;173:5148-5155
- Mutwiri G, Pontarollo R, Babiuk S, Griebel P, van Drunen Littel-van den Hurk S, Mena A, Tsang C, Alcon V, Nichani A, Ioannou X, Gomis S, Townsend H, Hecker R, Potter A, Babiuk LA. Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;91:89-103
- He H, Crippen TL, Farnell MB, Kogut MH. Identification of CpG oligodeoxynucleotide motifs that stimulate nitric oxide and cytokine production in avian macrophage and peripheral blood mononuclear cells. *Dev Comp Immunol* 2003;27:621-627
- Gursel M, Verthelyi D, Gursel I, Ishii KJ, Klinman DM. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol* 2002;71:813-820
- Dalpk AH, Zimmermann S, Albrecht I, Heeg K. Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. *Immunology* 2002;106:102-112
- Klinman DM, Currie D. Hierarchical recognition of CpG motifs expressed by immunostimulatory oligodeoxynucleotides. *Clin Exp Immunol* 2003;133:227-232
- Gursel M, Verthelyi D, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides induce human monocytes to mature into functional dendritic cells. *Eur J Immunol* 2002;32:2617-2622
- Kato A, Ogasawara T, Homma T, Batchelor J, Imai S, Wakiguchi H, Saito H, Matsumoto K. CpG oligodeoxynucleotides directly induce CXCR3 chemokines in human B cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:1139-1147
- Zhu LX, Liu J, Ye Y, Xie YH, Kong YY, Li GD, Wang Y. A candidate DNA vaccine elicits HCV specific humoral and cellular immune responses. *World J Gastroenterol* 2004;10:2488-2492
- Mena A, Nichani AK, Popowich Y, Godson DL, Dent D, Townsend HG, Mutwiri GK, Hecker R, Babiuk LA, Griebel P. Innate immune responses induced by CpG oligodeoxynucleotide stimulation of ovine blood mononuclear cells. *Immunology* 2003;110:250-257
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001:32-36
- Fujimaki H, Nohara K, Kobayashi T, Suzuki K, Eguchi-Kasai K, Tsukumo S, Kijima M, Tohyama C. Effect of a single oral dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune function in male NC/Nga mice. *Toxicol Sci* 2002;66:117-124
- 韩春卉, 李业鹏, 李燕俊, 李玉伟, 江涛, 赵熙, 钟凯, 张靖, 陈庭君, 计融. 乙醇对小鼠免疫系统影响的研究. *中国食品卫生杂志* 2004;16:221-223
- 吴克明, 曾婧, 曾南. 清宫止血颗粒对免疫低下小鼠免疫功能的影响. *中西医结合学报* 2004;2:203-205
- Jiao X, Wang RY, Qiu Q, Alter HJ, Shih JW. Enhanced hepatitis C virus NS3 specific Th1 immune responses induced by co-delivery of protein antigen and CpG with cationic liposomes. *J Gen Virol* 2004;85:1545-1553
- Lin L, Gerth AJ, Peng SL. CpG DNA redirects class-switching towards "Th1-like" Ig isotype production via TLR9 and MyD88. *Eur J Immunol* 2004;34:1483-1487
- Yi AK, Yoon JG, Yeo SJ, Hong SC, English BK, Krieg AM. Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 Production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-Mediated Th1 Response. *J Immunol* 2002;168:4711-4720
- Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* 2004;199:201-216
- Johansson E, Wallgren P, Fuxler L. The DNA vaccine vector pcDNA3 induces IFN- α production in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87:29-40
- 刘建文, 施用晖, 乐国伟, 方希修. 外源质粒 DNA 经小鼠胃肠道的吸收代谢动力学. *世界华人消化杂志* 2004;12:1108-1113
- Palka-Santini M, Schwarz-Herzke B, Hosel M, Renz D, Auerochs S, Brondke H, Doerfler W. The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins. *Mol Genet Genomics* 2003;270:201-215
- Shimosato T, Kitazawa H, Katoh S. Swine Toll-like receptor 9 (1) recognizes CpG motifs of human cell stimulant. *Biochim Biophys Acta* 2003;1627: 56-61
- He B, Qiao X, Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J Immunol* 2004;173:4479-4491
- Vollmer J, Weeratna RD, Jurk M, Samulowitz U, McCluskie MJ, Payette P, Davis HL, Schetter C, Krieg AM. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* 2004;113:212-223
- Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 2004;173:3916-3924
- Amcheslavsky A, Zou W, Bar-Shavit Z. Toll-like receptor 9 regulates TNF- α expression by different mechanisms: Implications for osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2004 [Epub ahead of print]
- Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursel M, Klinman DM. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin Immunol* 2004;16:17-22
- Ashkar AA, Rosenthal KL. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr Mol Med* 2002;2:545-556
- Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L. Moretta CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: Induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10116-10121
- Li Y, Ishii K, Hiseada H, Hamano S, Zhang M, Nakanishi K, Yoshimoto T, Hemmi H, Takeda K, Akira S, Iwakura Y, Himeno K. IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in Leishmania major-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther* 2004;11:941-948

抗性淀粉结肠内酵解对大鼠肠道健康的影响

杨月欣, 王竹, 洪洁, 王国栋, 何梅, 沈湘

杨月欣, 王竹, 洪洁, 王国栋, 何梅, 沈湘, 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所食物营养评价室 北京市 100050
杨月欣, 女, 1955-10-22 生, 河北省衡水市人, 汉族, 食物营养评价室主任, 研究员, 博士生导师。
国家自然科学基金资助项目, No. 30070657
项目负责人: 杨月欣, 100050, 北京市南纬路 29 号, 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所食物营养评价室. yxyang@public3.bta.net.cn
电话: 010-83132912
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-09-19

Effects of resistant starch fermentation on physiological changes of colon in rats

Yue-Xin Yang, Zhu Wang, Jie Hong, Guo-Dong Wang, Mei He, Xiang Shen

Yue-Xin Yang, Zhu Wang, Jie Hong, Guo-Dong Wang, Mei He, Xiang Shen, Department of Food Nutrition Assessment, National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30070657
Correspondence to: Yue-Xin Yang, Department of Food Nutrition Assessment, National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, 29 Nanwei Road, Beijing 100050, China. yxyang@public3.bta.net.cn
Received: 2004-08-16 Accepted: 2004-09-19

Abstract

AIM: To evaluate the effects of resistant starch (RS) fermentation on colon health-related indexes, including bowel functions, luminal short-chain fatty acid production and toxic compounds excretion.

METHODS: Fifty-seven healthy male SD rats were randomly divided into 5 groups based on body weight, and given basal diets with 0%, 6% and 12% RS, or high-protein diets (36% casein, HP) with 6% or 12% RS, respectively. After fed for 3 wk, gut transit time (GTT) for rats in each group was examined; at 5 wk three day feces samples were collected and their contents were assessed; at 7 wk all rats were killed. The morphological and histological characteristics of caecum were observed and the caecal function was evaluated by determination of the weight of caecal wall and caecal digesta, detection of caecal short chain fatty acid (SCFA), ammonia, phenol concentration and pH value.

RESULTS: In comparison with those in rats fed with 0% RS diet, shortened GTT was significantly shortened (601 ± 49 min vs 700 ± 58 min, $P < 0.001$), stool bulk was increased with more moisture (1.04 ± 0.22 g vs 0.37 ± 0.12 g, $P < 0.001$), and weight of caecal wall and caecal digesta was also increased (1.12 ± 0.14 g vs 0.73 ± 0.13 g, $P < 0.001$; 4.78 ± 1.44 g vs 3.00 ± 1.12 g, $P = 0.004 < 0.01$) in rats fed

with 12% RS diet; the concentration of SCFA in caecum was two- to three-fold enhanced by 12% RS (35.5 ± 11.4 $\mu\text{mol/g}$ vs 13.9 ± 6.7 $\mu\text{mol/g}$, $P = 0.003 < 0.01$), while the concentration of ammonia in both feces and caecum and phenol in caecum decreased (0.26 ± 0.13 mg/g vs 0.59 ± 0.15 mg/g, 0.35 ± 0.13 mg/g vs 0.63 ± 0.13 mg/g, 2.03 ± 0.42 mg/g vs 3.15 ± 0.55 mg/g, $P < 0.001$, respectively); caecal and fecal pH value dropped significantly (6.26 ± 0.36 vs 7.46 ± 0.28 ; 5.67 ± 0.31 vs 7.24 ± 0.31 , $P < 0.001$), and the variation of pH in feces was greater than that in caecum ($P < 0.001$), suggesting extended fermentation in distal colon. Rats in 6% RS group had similar but intermediate variances in fecal ammonia, caecal phenol and intestinal pH value ($P < 0.05$). All indexes mentioned above were dose-dependent ($P < 0.01$). For rats fed with HP, GTT was prolonged. Fecal bulk and caecal SCFA level dropped in HP+12% RS group (659 ± 47 min, $P = 0.009 < 0.01$; 0.80 ± 0.29 g, $P = 0.005 < 0.01$, 24.6 ± 13.6 $\mu\text{mol/g}$, $P = 0.043 < 0.05$), compared with 12% RS group. The concentrations of caecal phenol in HP+6% RS and HP+12% RS group were 3.20 ± 0.49 mg/g and 2.71 ± 0.55 mg/g respectively, significantly higher than that in 6% and 12% RS groups ($P < 0.001$); fecal and caecal pH value elevated as well. However, as RS intake increased (12%), these negative changes above were attenuated ($P < 0.05$). There was a significant interaction between RS and casein on fecal dry matter and caecal pH value ($P < 0.01$). Histological observation showed no abnormal changes in caecum tissues of rats fed with RS.

CONCLUSION: RS is beneficial to sustain intestinal health-related indexes and has potential protective effects on bowel functions. Adequate RS intake could attenuate the negative effects of high casein on colon by improving bowel habit, acidifying intestinal tract, promoting SCFA production and decreasing intestinal inner noxious phenol.

Yang YX, Wang Z, Hong J, Wang GD, He M, Shen X. Effects of resistant starch fermentation on physiological changes of colon in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2618-2622

摘要

目的: 探讨不同浓度抗性淀粉(RS), 特别在高蛋白饲养模式下, 对实验大鼠肠道功能、肠内短链脂肪酸和有害及酵解产物等健康指标的影响。

方法: 57 只健康♂ SD 大鼠根据体重随机分成 5 组, 分别给予含有 0%, 6% 和 12% RS 的基础饲料, 或含有 6% 和 12% RS 的高蛋白饲料(36% 酪蛋白, HP)喂养。实验 3 wk 进行肠道转运时间(GTT)的观察实验; 5 wk 连续收集 3 d 粪便; 7 wk 处死大鼠, 取盲肠进行形态学和组织学观察, 并对盲肠内容物中的短链脂肪酸(SCFA)、氨、酚含量以及肠道 pH 进行测定。

结果:和0% RS组大鼠相比, 12% RS组大鼠 GTT 明显缩短(601 ± 49 min vs 700 ± 58 min, $P < 0.001$), 粪便量、盲肠壁及盲肠内容物质量显著增加(分别为 1.04 ± 0.22 g vs 0.37 ± 0.12 g, 1.12 ± 0.14 g vs 0.73 ± 0.13 g, $P < 0.001$; 4.78 ± 1.44 g vs 3.00 ± 1.12 g, $P = 0.004 < 0.01$); 盲肠内 SCFA 增加 2–3 倍(35.5 ± 11.4 μ mol/g vs 13.9 ± 6.7 μ mol/g, $P = 0.003 < 0.01$); 粪氨、盲肠内氨及酚浓度下降(0.26 ± 0.13 mg/g vs 0.59 ± 0.15 mg/g, 0.35 ± 0.13 mg/g vs 0.63 ± 0.13 mg/g, 2.03 ± 0.42 mg/g vs 3.15 ± 0.55 mg/g, $P < 0.001$); 盲肠和粪便 pH 值减低(6.26 ± 0.36 vs 7.46 ± 0.28 , 5.67 ± 0.31 vs 7.24 ± 0.31 , $P < 0.001$), 且粪便 pH 值显著低于盲肠 pH 值($P < 0.001$), 提示 RS 使远端结肠发酵增加。6% RS 组粪氨、盲肠酚及肠道 pH 值亦有中度下降($P < 0.05$)。以上各指标与 RS 摄入量存在明显的剂量反应关系($P < 0.01$)。和相应等剂量 RS 组相比, HP+12%RS 组大鼠 GTT 延长(659 ± 47 min, $P = 0.009 < 0.01$), 粪便量减少(0.80 ± 0.29 g, $P = 0.005 < 0.01$), 盲肠内容物 SCFA 降低(24.6 ± 13.6 μ mol/g, $P = 0.043 < 0.05$); HP+6RS%组和 HP+12RS%组盲肠内酚浓度增加(分别为 3.20 ± 0.49 mg/g, 2.71 ± 0.55 mg/g, $P < 0.001$), 且肠道 pH 升高。但随着 RS 摄入的增加, 这一现象有所缓解, HP+12%RS 组粪便水分, 盲肠 SCFA、氨、酚浓度及 pH 值均与 HP+6% 组有显著差异($P < 0.05$)。RS 和酪蛋白对粪便干质量和盲肠 pH 值有显著交互作用($P < 0.01$)。组织病理切片未显示实验期间 RS 喂养大鼠盲肠壁细胞出现异常变化。

结论: RS 有助于维持肠道健康相关指标, 适量摄取可改善高酪蛋白饮食引起的肠道功能改变, 起到酸化肠道, 促进肠内有益产物 SCFA 生成, 降低有毒代谢产物酚的作用。

杨月欣, 王竹, 洪洁, 王国栋, 何梅, 沈湘. 抗性淀粉结肠内酵解对大鼠肠道健康的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2618–2622
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2618.asp>

0 引言

胃肠动力紊乱、肠道菌群失调、肠内毒素滞留、肠内环境改变常可诱发肠道癌症的发生。食物的精细化生产, 高热量、高脂、高蛋白食物的过多摄入, 不良的饮食习惯, 又是引起这些病症的重要原因。碳水化合物是人类膳食中最主要的成分, 和传统认识上的淀粉可完全被机体利用的观点不同, 人们在研究中逐渐发现部分淀粉因结构、来源不同而不能被小肠内的淀粉酶所消化^[1], 欧洲抗性淀粉研究工作组(EURESTA)和 FAO 将“健康人小肠内不消化的淀粉及其降解产物”定义为抗性淀粉(resistant starch, RS)^[2]。由于 RS 可以“逃逸”小肠消化而到结肠内代谢, 因此淀粉对肠道的健康意义, 特别是在当今高脂、高蛋白的饮食模式下, 淀粉类型与肠道健康的关系需要重新评估。我们从结肠内酵解入手, 探讨了 RS 对实验动物肠道动力学、排便习惯、肠内环境的影响, 特别是在高蛋白饮食饲养模式下对

肠道有益酵解产物和肠道毒素生成的影响, 为证明 RS 的肠道健康作用补充依据。

1 材料和方法

1.1 材料 普通淀粉由北京市场购得普通玉米源食用淀粉, 按 Champ^[3]方法测定 RS 含量为 0%; Hylon VII 由美国国民淀粉公司提供, 为玉米源工业加工淀粉, 经测定 RS 含量为 50%。57 只健康成年 δ SD 大鼠, 二级, 体质量 140–180 g, 购自中国医学科学院动物繁育中心。进入二级动物房并适应环境 3 d。根据体质量随机将大鼠分为 5 组, 其中 3 组分别给予 RS 含量为 0%、6% 和 12% 的基础饲料, 另外 2 组大鼠给予含 6% RS 和 12% RS 的高蛋白饲料(HP+6%RS, HP+12%RS)。饲料配方根据 AIN⁷⁶略作调整。基础饲料中各组分含量分别为(g/kg): 酪蛋白 180, 淀粉 594.5, 植物油 50, DL-蛋氨酸 3, 纤维素 20, 混合维生素 10, 混合矿物质 40。其中 0%RS 组饲料中的淀粉全部采用普通淀粉; 6%RS2 和 12%RS2 组饲料中分别含有 12% 和 24% 的 Hylon VII, 其余用普通淀粉配齐。高蛋白饲料中酪蛋白含量为 360 g/kg, 淀粉为 414.5 g/kg, 其余成分同基础饲料。

1.2 方法 将实验动物于二级动物房内分笼饲养, 室温维持在(24 ± 2 $^{\circ}$ C), 相对湿度控制在(50 ± 10 %), 照明时间为昼夜 12:12。实验期间动物自由进食及饮水, 每天记录进食量, 每 3 d 测体质量 1 次。实验 3 wk 进行肠道转运时间(GTT)观察实验, 各组大鼠禁食过夜, 于次日清晨空腹条件下灌予 2 mL 用碳末标记的饲料混悬液(200 g/L), 记录灌胃时间并恢复正常饮食, 观察大鼠从灌胃开始至排出首粒黑便的时间。实验 5 wk 进行排便实验, 连续 3 d 收集大鼠新鲜粪便, 测定粪便质量、水分、pH 值、氨含量。实验 7 wk, 空腹过夜条件下处死大鼠, 分离盲肠, 测定盲肠质量、容量; 取盲肠壁进行组织切片检查; 取盲肠内容物测定 pH、酵解产物短链脂肪酸(SCFA)及氨和酚的含量。粪便、盲肠、盲肠壁及内容物质量采用称质量法; pH 值采用电位法(pH 计); 氨测定采用改良的 Helen McCullough 方法, 即取样品匀浆液去蛋白后, 取上清液, 先后与含有苯酚、硝普钠的显色剂 1 和含有 Na_2HPO_4 , NaOH 和 HClO_3 的显色剂 2 反应, 比色测定; SCFA 采用 GC 法^[4]; 酚(对甲酚和苯酚)含量测定采用 HPLC 法^[5]。

统计学处理 各检测指标均以 mean \pm SD 表示。组间差异的检验首先进行方差齐性检验, 如方差齐性, 继续采用 one way ANOVA 进行分析, 如方差不齐转换数据后再进行分析; 影响因素分析采用多因素方差分析, 相关分析采用 Pearson 法, 检验水准 α 为 0.05。所有统计学分析采用 SPSS 软件包。

2 结果

实验期间各组大鼠饮食活动正常, 12%RS 组进食量和体质量增长略有升高趋势, 但与其他各组没有显著

性差异(表1)。

2.1 RS对实验大鼠排便习惯的影响 RS能加快食物在肠道内的转运速度;促进粪便排出,增加粪便量;使粪便水分含量增加,起到软化粪便的作用。其中12%RS组GTT,粪便干质量和水分含量均和0%RS组有显著性差异($P<0.001$),6%RS组变化趋势一致,RS对各指标的影响存在着显著的剂量反应关系($P<0.001$)。和相应等剂量RS组相比,高蛋白饲养大鼠GTT延长($P=0.009<0.01$),粪便干质量降低($P=0.005<0.01$),水分含量减少($P=0.011<0.05$),HP+12%RS组与12%RS组相比有较显著的差异,说明高蛋白饮食可影响大鼠正常排便习惯。但随着RS摄入增加,这一现象有所缓解(表1)。

2.2 RS酵解对盲肠壁的影响 和0%RS组相比,给予RS的大鼠盲肠体积增大,无论6%RS组还是12%RS组盲肠总质量、盲肠壁质量、盲肠壁质量/体质量比以及盲肠内容物质量均呈增加趋势,其中6%RS组盲肠内容物质量和12%RS组各指标与0%RS组有显著性差异(表2)。病理组织切片检查未见给予RS的大鼠发生异常的组织变化。与相应等剂量RS组相比,高蛋白组大

鼠上述指标没有显著差异,提示高蛋白饮食对盲肠容积没有显著影响。

2.3 RS对酵解产物生成的影响 12%RS组大鼠盲肠内乙酸、丙酸、丁酸及总SCFA浓度明显高于0%RS组和6%RS组($P=0.003<0.01$),约是0%RS组的2-3倍,各个SCFA浓度与RS摄入之间存在显著的剂量反应关系($P<0.001$),乙酸:丙酸:丁酸摩尔比为36:39:25(0%RS组为29:51:20)(表3)。和SCFA相反,6%RS组和12%RS组大鼠粪氨、盲肠内容物中氨和酚的浓度均比0%RS组显著降低($P<0.001$),氨、酚水平与RS摄入呈显著负相关;综合考虑各组大鼠粪便排出总量和盲肠内容物总质量,可见6%RS组和12%RS组大鼠有毒代谢产物的排出总量与0%RS组一致,提示RS对肠道内有毒代谢产物起到了稀释作用。和相应等剂量的RS组相比,高蛋白组大鼠盲肠内SCFA水平有所降低,酚水平(包括苯酚和对甲酚)升高。采用多因素方差分析,证明高蛋白摄入是引起肠内酚含量增高的重要因素($F=32.28, P<0.001$)。但随着RS摄入的增加,SCFA水平亦呈上升趋势,HP+12%RS组乙酸和丁酸浓度明

表1 抗性淀粉对大鼠饮食、体质量增长和排便习惯的影响(mean±SD, g)

分组	<i>n</i>	末期	初始	体质量增长	进食量/d	GTT(min)	粪便干质量/d	粪便水分(%)
0%RS	11	335 ± 35	169 ± 14	167 ± 33	15.0 ± 2.5	700 ± 58	0.37 ± 0.12	30.5 ± 7.3
6%RS	12	324 ± 23	168 ± 15	156 ± 28	14.6 ± 2.3	662 ± 53	0.45 ± 0.16	35.6 ± 8.0
12%RS	12	360 ± 46	168 ± 13	188 ± 47	17.5 ± 3.3	601 ± 49 ^{bc}	1.04 ± 0.22 ^{bd}	44.8 ± 8.8 ^{bd}
HP+6%RS	11	331 ± 31	167 ± 16	164 ± 38	15.8 ± 1.9	673 ± 55	0.71 ± 0.19 ^d	29.8 ± 5.4
HP+12%RS	12	355 ± 29	168 ± 13	187 ± 25	16.8 ± 1.1	659 ± 47 ^f	0.80 ± 0.29 ^f	36.4 ± 8.2 ^{ef}

^b $P<0.01$ vs 0% RS; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 6%RS; ^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ vs 12% RS; ^g $P<0.05$ vs HP+6% RS。

表2 抗性淀粉对大鼠盲肠质量的影响(mean±SD, g)

分组	<i>n</i>	盲肠总质量	盲肠壁质量	盲肠壁/体质量比(%)	内容物质量
0%RS	11	3.73 ± 1.14	0.73 ± 0.13	0.22 ± 0.07	3.00 ± 1.12
6%RS	12	4.96 ± 1.62 ^a	0.82 ± 0.26	0.25 ± 0.08	4.14 ± 1.78 ^a
12%RS	12	5.90 ± 1.49 ^b	1.12 ± 0.14 ^{bd}	0.33 ± 0.06 ^{bc}	4.78 ± 1.44 ^b
HP+6%RS	11	4.14 ± 1.05	0.86 ± 0.15	0.27 ± 0.05	3.28 ± 0.98
HP+12%RS	12	6.45 ± 1.25 ^f	1.13 ± 0.16 ^f	0.33 ± 0.05 ^f	5.32 ± 1.23 ^f

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 0%RS; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 6%RS; ^e $P<0.01$ vs HP+6%RS。

表3 抗性淀粉对盲肠内有益酵解产物生成的影响(mean±SD, μmol/g)

分组	<i>n</i>	乙酸	丙酸	丁酸	总SCFA
0%RS	11	4.6 ± 3.2	6.1 ± 2.5	3.2 ± 2.2	13.9 ± 6.7
6%RS	12	6.8 ± 5.0	7.1 ± 5.2	4.6 ± 3.4	18.5 ± 13.0
12%RS	12	12.4 ± 4.6 ^b	13.9 ± 6.3 ^b	8.5 ± 3.1 ^b	35.5 ± 11.4 ^b
HP+6%RS	11	5.4 ± 3.4	5.9 ± 2.5	3.7 ± 2.3	15.0 ± 7.7
HP+12%RS	12	9.3 ± 6.0 ^e	8.9 ± 4.3	6.4 ± 4.1 ^e	24.6 ± 13.6 ^{ee}

^b $P<0.01$ vs 0%和6%RS; ^c $P<0.05$ vs 12%RS; ^e $P<0.05$ vs HP+6%RS。

表4 抗性淀粉对有毒代谢物生成的影响(mean±SD, mg/g)

分组	n	氨		酚		
		盲肠内容物	粪便	苯酚	对甲酚	总酚
0%RS	11	0.63 ± 0.13	0.59 ± 0.15	1.05 ± 0.15	2.10 ± 0.43	3.15 ± 0.55
6%RS	12	0.51 ± 0.22	0.42 ± 0.17 ^a	0.78 ± 0.11 ^b	1.67 ± 0.29 ^b	2.46 ± 0.36 ^b
12%RS	12	0.35 ± 0.13 ^{bd}	0.26 ± 0.13 ^{bc}	0.59 ± 0.16 ^{bd}	1.43 ± 0.30 ^b	2.03 ± 0.42 ^{bd}
HP+6%RS	11	0.52 ± 0.13	0.44 ± 0.17	1.05 ± 0.19 ^d	2.15 ± 0.39 ^d	3.20 ± 0.49 ^d
HP+12%RS	12	0.35 ± 0.07 ^b	0.29 ± 0.11 ^c	0.86 ± 0.15 ^{dh}	1.85 ± 0.42 ^d	2.71 ± 0.55 ^{dx}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 0%RS; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 6%RS; ^e $P<0.01$ vs 12%RS; ^f $P<0.05$, ^g $P<0.01$ vs HP+6%RS.

显高于 HP+6%RS 组($P=0.018<0.05$), 且酚浓度显著下降($P=0.001<0.01$), 说明增加 RS 的摄入(12%)可以降低高蛋白引起的结肠内有毒产物的过高分泌(表 4).

2.4 RS 对维持肠道酸性环境的影响 实验后期随着 RS 摄入的增加, 盲肠内容物和粪便 pH 显著下降; 和相应等剂量 RS 组相比, 食用高蛋白饲料的大鼠肠道 pH 较高, 但增加 RS 摄入可以有效地缓解这一变化, 有助于维持肠道酸性环境. 和盲肠内容物 pH 相比, 给予 RS 的各实验组大鼠粪便 pH 值下降得更多($P<0.01$), 提示末端结肠酵解程度可能更高, 受食物影响也更大(表 5).

表5 抗性淀粉对肠道 pH 值的影响(mean±SD)

组别	n	盲肠内容物	粪便	
			实验前	实验后
0%RS	11	7.46 ± 0.28	7.24 ± 0.20	7.24 ± 0.31
6%RS	12	7.18 ± 0.31 ^a	7.23 ± 0.22	6.12 ± 0.20 ^{bi}
12%RS	12	6.26 ± 0.36 ^{bd}	7.20 ± 0.14	5.67 ± 0.31 ^{bd}
HP+6%RS	11	7.48 ± 0.29 ^c	7.20 ± 0.25	6.52 ± 0.24 ^{di}
HP+12%RS	12	7.14 ± 0.32 ^h	7.22 ± 0.15	5.93 ± 0.34 ^{dh}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 0%RS; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 6%RS; ^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ vs 12%RS; ^g $P<0.01$ vs HP+6%RS; ^h $P<0.01$ vs 本组盲肠内容物.

2.5 RS 摄入量与各指标的相关性及析因分析 采用 Pearson 相关分析证明, 在本剂量范围内, RS 摄入量与胃肠道转运时间显著负相关($P<0.01$), 与结肠质量和有益酵解产物的生成呈显著正相关($P<0.01$), 与肠道 pH 值和有害酵解产物负相关($P<0.01$). 多因素方差分析结果表明, 蛋白质能显著影响 GTT, 减少肠道内丙酸生成($P<0.05$), 降低粪便水分含量, 增加盲肠内酚含量及升高肠道 pH 值($P<0.01$). RS 和蛋白质对粪便干质量、盲肠 pH 值有显著交互作用($P<0.01$).

3 讨论

在肠道癌症发生中, 膳食因素和肠道菌群是引起肠道微环境变化的关键, 流行病学研究表明, 膳食能量、宏亮营养素的高摄入与肠道癌症发生密切相关^[6]; 而在我国上海人群的调查实验中, 红肉、鱼、鸡蛋等食

物摄入的增加是加大结肠癌发生危险性的相关因素^[7], 糖、淀粉等生糖碳水化合物(glycemic carbohydrate)又可能与其有着交互影响^[8].

碳水化合物的生糖特性与其在小肠内消化的速度密切相关, 不消化碳水化合物(indigestible carbohydrate, IDC)可逃逸小肠消化, 进入结肠酵解. 酵解是不消化物一种有效的代谢吸收方式, 非淀粉多糖、RS、低聚糖等, 或消化道分泌的消化液、脱落的黏膜细胞, 可作为底物为肠道菌群所利用, 以挽回部分能量. SCFA 是 IDC 酵解的主要终产物, 可再为肠上皮细胞吸收, 被肝脏和肌肉代谢. 作为结肠内主要的阴离子, SCFA 最重要的特性是对肠道上皮的营养作用; 并可降低肠道 pH, 维护肠黏膜的防御屏障; 促进和改善结肠微循环, 与结肠癌发生负相关. 其中丁酸是最为有效的肠道细胞营养物质, 不仅提供能量, 且对调节细胞的生长和分化^[9], 维持细胞形态, 促进瘤细胞向非瘤细胞转化有重要意义. 由于 SCFA 可以促进肠道电解质和水的吸收, 目前已有一些研究将 SCFA(如丁酸钠)作为临床药物用于治疗肠道炎症、腹泻^[10], 改善肠道手术或肠道管饲引起的排便功能下降^[11-12]. 但限于用量和长期疗效的不确定, 所以探讨利用食物成分刺激肠内有益菌繁殖和内源性 SCFA 生成显得十分重要. 受 GTT、酸性条件、药物、其他膳食等因素的影响, 不同碳水化合物对肠内 SCFA 产生部位、数量、种类的影响有所不同^[13-14], 如果胶类食物酵解后乙酸百分比相对较高(80%). 和其他类型 IDC 相比, RS 在结构上属于淀粉, 外观、口感、性状和可接受性更符合人体需要, 且在肠道内的酵解是相当完全的, 代谢率达 94% 以上^[15-16], 是刺激 SCFA 生成的最好底物, 增加乙酸和丁酸的摩尔比^[17-18](这一结果在我们的研究中得到证实), 对结肠生理功能的影响可能也更大^[19]. 另一方面, 和淀粉相比, RS 可以延缓餐后葡萄糖的吸收, 降低血糖, 对预防葡萄糖耐量低减、高胰岛素血症有利^[20]. 而胰岛素抵抗又可增加结肠癌症发生的危险性^[21].

尽管 RS 的肠道健康作用得到越来越多的证实, 但是其对降低损害肠道黏膜的有害物质 - 包括氨、酚、N-亚硝基等的能力, 预防和治疗结肠疾病的作用尚需要进一步的评估^[22]. 氨、胺、酚、吲哚等是不消化蛋

白质在结肠内腐败的主要产物. 氨(NH₃)能改变结肠表皮细胞的形态和代谢, 被认为是结肠内潜在的肿瘤促进因子, 可促进肠道内的肿瘤转化. 酚和吲哚本身虽不是致癌物, 但却可辅助致癌. 我们利用酪蛋白设计了两个蛋白质摄入水平, 以探讨 RS 对肠道内氨、酚分泌的影响. 结果表明, 在蛋白质摄入相同的情况下, 高 RS 可使肠道氨、酚浓度下降, 这可能是由于 RS 为肠内细菌提供了合适的底物和丰富的能量来源, 促使了细菌迅速增生, 并将氮氮用于菌体蛋白质合成, 使结肠内以碳水化合物为底物的细菌增生增多, 抑制了蛋白质腐败菌的增生, 减少了腐败物的产生以及肠道对氨的吸收, 同时肠道内 SCFA 和酸性环境也直接影响氨的吸收, 使氮表观吸收率降低^[6]. 在高酪蛋白饲养模式下, 大鼠肠道内 SCFA 显著下降, 酚浓度上升, 氨却没有显著变化, 12%RS 能有效缓解这些变化. 一些证据表明, 尽管蛋白质的过高摄入与结肠癌发生有关, 但蛋白质来源的影响也不容忽视. 体外实验研究表明, 酪蛋白可以促进 SCFA 的产生, 说明酪蛋白可以为细菌提供丰富的氮源, 从而促进发酵^[23]. 但在一些化学制剂诱导的肠道肿瘤动物模型中, 喂养酪蛋白及其降解肽的动物比食用等量的乳清蛋白、大豆蛋白的动物更易发生结肠癌^[24-26]. 而且我们研究证据表明蛋白质虽未能影响盲肠容积, 但对盲肠 pH 却与 RS 有交互影响, 提示二者可能通过不同的途径影响肠道发酵, 使发酵产物配比改变. 高酪蛋白影响结肠癌症发生的机制是否与酚而非氨的高分泌有关需要进一步研究.

除此之外, 适量给予 RS 可以较好地改善肠道动力, 增加肠道容积, 促进肠道有益菌的定植^[27], 维持肠道内酸性环境. 研究表明流行病学资料显示肠道 pH 下降 0.5, 可降低结肠癌的危险. RS 不仅可以降低肠道 pH, 且对末端 pH 影响更大, 提示除了盲肠内可能有由小肠进入的碱性消化液外, 末端结肠的酵解程度更高, 受食物影响也更大. 由于结肠疾病尤其是结肠癌更多见于末端结肠, 因此 RS 对末端结肠 pH 的影响显得更具有重要意义. 关于 RS 预防和治疗肠道疾患、维持肠道健康作用的机制, 以及 RS 与蛋白质、脂肪和其他碳水化合物之间的交互作用尚需进一步研究.

4 参考文献

- Englyst HN, Kingman SM, Cummings JH. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur J Clin Nutr* 1992;46(Suppl 2):S33-50
- FAO. Carbohydrates in Human Nutrition. FAO Food and Nutrition Paper 66, Rome: FAO 1998:1-5
- Champ M. Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. *Eur J Clin Nutr* 1992;46(Suppl 2):S51-62
- Topping DL, Illman RJ, Clarke JM, Trimble RP, Jackson KA, Marsono Y. Dietary fat and fiber alter large bowel and portal venous volatile fatty acids and plasma cholesterol but not biliary steroids in pigs. *J Nutr* 1993;123:133-143
- Birkett AM, Jones GP, Muir JG. Simple high-performance liquid chromatographic analysis of phenol and p-cresol in urine and feces. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995;674:187-191

- Satia-Abouta J, Galanko JA, Potter JD, Ammerman A, Martin CF, Sandler RS. North carolina colon cancer study. Associations of total energy and macronutrients with colon cancer risk in African Americans and Whites: results from the North Carolina colon cancer study. *Am J Epidemiol* 2003;158:951-962
- Chiu BC, Ji BT, Dai Q, Gridley G, McLaughlin JK, Gao YT, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Dietary factors and risk of colon cancer in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:201-208
- Favero A, Parpinel M, Montella M. Energy sources and risk of cancer of the breast and colon-rectum in Italy. *Adv Exp Med Biol* 1999;472:51-55
- Cai J, Chen Y, Murphy TJ, Jones DP, Sartorelli AC. Role of caspase activation in butyrate-induced terminal differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys* 2004;424:119-127
- 李可洲, 李宁, 黎介寿, 鲍扬, 李幼生. 短链脂肪酸对大鼠移植小肠形态及功能的作用研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:720-722
- Lewis SJ, Heaton KW. Increasing butyrate concentration in the distal colon by accelerating intestinal transit. *Gut* 1997;41:245-251
- Whelan K, Judd PA, Preedy VR, Taylor MA. Enteral feeding: the effect on faecal output, the faecal microflora and SCFA concentrations. *Proc Nutr Soc* 2004;63:105-113
- Govers MJ, Gannon NJ, Dunshea FR, Gibson PR, Muir JG. Wheat bran affects the site of fermentation of resistant starch and luminal indexes related to colon cancer risk: a study in pigs. *Gut* 1999;45:840-847
- Oufir LE, Barry JL, Flourie B, Cherbut C, Cloarec D, Bornet F, Galmiche JP. Relationships between transit time in man and in vitro fermentation of dietary fiber by fecal bacteria. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:603-609
- 王竹, 杨月欣, 周瑞华, Vonk RJ, 江骥. 抗性淀粉的代谢及对血糖的调节作用. *营养学报* 2003;25:190-195
- 王竹, 王国栋, 何梅, 杨月欣. 体内外实验测定淀粉的消化吸收特性. *卫生研究* 2004;33:470-472
- Bird AR, Hayakawa T, Marsono Y, Gooden JM, Record IR, Correll RL, Topping DL. Coarse brown rice increases fecal and large bowel short-chain fatty acids and starch but lowers calcium in the large bowel of pigs. *J Nutr* 2000;130:1780-1787
- Moreau NM, Martin LJ, Toquet CS, Laboisie CL, Nguyen PG, Siliart BS, Dumon HJ, Champ MM. Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Br J Nutr* 2003;90:75-85
- Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001;81:1031-1064
- 王竹, 杨月欣, 韩军花, 门建华, 洪洁. 抗性淀粉对饮食诱发葡萄糖耐量异常的预防. *营养学报* 2002;24:48-52
- Komninou D, Ayonote A, Richie JP Jr, Rigas B. Insulin resistance and its contribution to colon carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:396-405
- Kendall CW, Emam A, Augustin LS, Jenkins DJ. Resistant starches and health. *J AOAC Int* 2004;87:769-774
- 孙晓红, Heiner AM, Elzinga H, Vonk RJ. 影响肠道细菌发酵因素的体外研究. *营养学报* 2003;25:312-315
- Hakkak R, Korourian S, Ronis MJ, Johnston JM, Badger TM. Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:555-558
- Hakkak R, Korourian S, Ronis MJ, Johnston JM, Badger TM. Soy protein isolate consumption protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. *Cancer Lett* 2001;166:27-32
- Oliveira MJ, Van Damme J, Lauwaet T, De Corte V, De Bruyne G, Verschraegen G, Vaneechoutte M, Goethals M, Ahmadian MR, Muller O, Vandekerckhove J, Mareel M, Leroy A. Beta-casein-derived peptides, produced by bacteria, stimulate cancer cell invasion and motility. *EMBO J* 2003;22:6161-6173
- Le Blay GM, Michel CD, Blottiere HM, Cherbut CJ. Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. *J Appl Microbiol* 2003;94:312-320

pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达质粒的构建及鉴定

任玥欣, 宋于刚, 陈学清, 智发朝, 钟世顺, 南清振, 武金宝, 崔忠林

任玥欣, 宋于刚, 陈学清, 智发朝, 钟世顺, 南清振, 武金宝, 崔忠林, 广州南方医科大学南方医院消化疾病研究所 广东省广州市 510515
任玥欣, 女, 1974-12-09 生, 山东省济南市人, 汉族. 2004 年广州南方医科大学博士, 讲师, 主要从事胰腺疾病诊断及治疗研究.
国家自然科学基金项目, No. 30370648
项目负责人: 宋于刚, 510515, 广东省广州市, 广州南方医科大学南方医院消化疾病研究所. drrren@tom.com
收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-19

Construction and identification of eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(+)-MCP-1 and pcDNA3.1(+)-Gro α

Yue-Xin Ren, Yu-Gang Song, Xue-Qing Chen, Fa-Chao Zhi, Shi-Shun Zhong, Qing-Zhen Nan, Jin-Bao Wu, Zhong-Lin Cui

Yue-Xin Ren, Yu-Gang Song, Xue-Qing Chen, Fa-Chao Zhi, Shi-Shun Zhong, Qing-Zhen Nan, Jin-Bao Wu, Zhong-Lin Cui, Institute of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30370648
Correspondence to: Dr. Yu-Gang Song, Institute of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. yz xu@fimmu.com
Received: 2004-08-17 Accepted: 2004-09-19

Abstract

AIM: To construct and identify the eukaryotic expression plasmid for rat MCP-1 and Gro α .

METHODS: According to the published MCP-1 Gro α cDNA sequence in GeneBank, a pair of primers were respectively designed and synthesized. The total RNA was isolated from rats with acute pancreatitis. After amplification with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the product was cloned into pGEM-T easy vector using TA cloning followed by *Bam* H I and *Eco* R I digestion. The target sequences were then subcloned into a highly efficient eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). The recombinants were finally sequenced and identified by restrictive endonuclease digestion.

RESULTS: pcDNA3.1(+)-MCP-1 and pcDNA3.1(+)-Gro α eukaryotic expression vectors were successfully constructed, and they were identified by PCR, double restrictive endonuclease digestion and sequence analysis. The target fragment MCP-1 was the same as AF058786 in GenBank and the fragment Gro α was different from NM_030845 (nt92-nt94) in GenBank. Repeated tests confirmed that NM_030845 (nt21-nt23) in GenBank was not correct.

CONCLUSION: The MCP-1 and Gro α eukaryotic expression vectors are successfully constructed and identified.

Ren YX, Song YG, Chen XQ, Zhi FC, Zhong SS, Nan QZ, Wu JB, Cui ZL. Construction and identification of eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(+)-MCP-1 and pcDNA3.1(+)-Gro α . Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11):2623-2626

摘要

目的: 构建并鉴定真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α .

方法: 据 GeneBank 中大鼠 MCP-1 和 Gro α cDNA 序列设计并合成引物, 提取急性胰腺炎模型大鼠总 RNA, RT-PCR 扩增, 并将扩增产物 TA 克隆至 pGEM-T easy 载体, 然后分别双酶切 pGEM-MCP-1 和 pGEM-Gro α 回收目的片段再克隆至真核表达载体 pcDNA3.1(+).

结果: pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达质粒构建完成后, 用限制性内切酶、PCR 及 DNA 序列分析等多种方法进行鉴定, 证实其构建成功.

结论: pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达质粒构建成功, 为进一步研究该真核表达质粒的免疫保护作用及制备急性胰腺炎 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α DNA 疫苗奠定了基础.

任玥欣, 宋于刚, 陈学清, 智发朝, 钟世顺, 南清振, 武金宝, 崔忠林. pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达质粒的构建及鉴定. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2623-2626
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2623.asp>

0 引言

急性胰腺炎是临床常见病, 重症胰腺炎死亡率可高达 17-20%, 其发病机制尚不完全清楚^[1-3]. 以往的观点认为, 胰腺炎是一种自身消化性疾病, 是由胰酶激活并自身消化所致. 但近来的研究结果发现, 胰腺腺泡细胞在接受刺激后, 可以分泌大量的炎性因子^[4-5]; 急性胰腺炎作为炎症的一种形式, 炎性因子在其发病中可能占居着主导作用^[6-11]. 我们用基因芯片技术, 研究了早期急性胰腺炎中的基因变化, 发现实验性大鼠急性胰腺炎早期诱导腺泡细胞高表达某些基因, 其编码翻译产物可被分泌入胰液或细胞间隙. 促炎因子多数在模型制备后 2-3 h 开始高表达, 但其中单核细胞趋化因子

(Monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、生长调节致癌基因 α (Growth-related oncogene α , GRO- α)被快速诱发高表达. 我们构建真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 的目的, 在于进一步明确 MCP-1 和 GRO- α 在急性胰腺炎发病中的作用, 并为研制 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 急性胰腺炎 DNA 疫苗奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌DH5 α 由本研究所保存. pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司, 高效真核表达载体 pcDNA3.1 (+)为 Invitrogen 公司产品. MCP-1 引物根据基因库 AF058786 (*Rattus norvegicus* JE/MCP-1 mRNA, complete cds)原始序列, 由 nt64-nt607; Gro α 引物据基因库 NM_030845 (*Rattus norvegicus* gro)原始序列, 由 nt3-nt448; 利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.22 上游引物设计加入 *Bam* H I 限制性酶切位点, 由上海博亚生物公司合成. 引物序列为 MCP-1 上游: 5' GGA TCC ACC ACT ATG CAG G 3', 下游: 5' TTC TAG TAT TCA TGG AAG GGA 3'; Gro α 上游: 5' GGA TCC AGC TCC AGC ACT C 3', 下游: 5' ATA AAT AGG ACC CTC AAT AGA AA 3'.

1.2 方法 ♂ Wistar 大鼠 18 只, 体重 200-280 g, 由南方医科大学动物中心提供, 清洁级, 由抽签随机分为 3 组($n = 6$), 即正常对照组、蛙皮素组(C-9026, Sigma)(C 组)及牛磺胆酸组(T 组). C 组: 禁食过夜(> 12 h), 超大剂量蛙皮素(10 μ g/kg)静脉注射, 注射后 1 h、2 h、4 h 各以过量的戊巴比妥处死大鼠. T 组: 禁食过夜, 常规麻醉, 在无菌操作下开腹, 作上腹正中切口 3 cm 左右, 找到胃十二指肠交界处, 再向下寻找到胰胆管十二指肠开口处. 在左右肝管汇合处以小动脉夹夹闭以防止向肝脏方向反流, 将 4.5 号针头平面朝上于胰胆管十二指肠开口处行被膜下穿刺, 并向胰管方向推进约 2-3 mm, 用另一血管夹固定针头, 将生理盐水稀释的 10 g/L 牛磺胆酸(T-4009, Sigma) 50 μ L 缓慢逆行推注至胰管中(> 20 s), 使整个胰胆管均匀隆起, 退出针头, 即用手压迫进针处约 3-5 min, 3-5 min 后去除肝总管动脉夹, 关腹, 并同时开始计时观察. 造模后 1 h、3 h 分别以过量的戊巴比妥处死大鼠, 取胰腺组织进行组织学分析、水肿评价及总 RNA 制备. 常规组织学处理, 用 PBS(PH7.4)缓冲的 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋及 HE 染色. 常规切片, 光镜观察.

1.2.1 总 RNA 提取、逆转录及 PCR 扩增 用 Trizol reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA)一步法提取胰腺总 RNA, 并用 RNeasy spin column (Qiagen Inc., Valencia, CA)进一步纯化总 RNA, 并用以此为模板制备 MCP-1、Gro α 片段. RT-PCR 简要步骤: 用 cDNA 合成试剂盒(Superscript Choice System, Invitrogen)、以 3' 端加有

T7RNA 启动子的 24 寡脱氧胸腺嘧啶(oliga(dT))为引物, 总 RNA 5 μ g 被逆转录为双链 cDNA; 随后分别应用各自相对应引物, 用 Pyrobest 高保真 DNA 聚合酶(大连 Takara 公司)进行 PCR 反应(95 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 循环), 大量合成第二链: MCP-1、Gro α 片段. 对 PCR 反应液进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 用 UVP-GD800 凝胶分析仪观察并记录结果, 选择 MCP-1、Gro α 表达较高者切胶回收目的 DNA 片段.

1.2.2 MCP-1 和 Gro α 片段 pGEM-T easy 载体克隆 扩增产物取适量回收的 MCP-1, Gro α 片段与 pGEM-T easy 载体进行 TA 克隆, 并转化 DH5 α , 经氨苄西林及 α -互补蓝白斑筛选阳性菌落, 根据 pGEM-T easy 靠近凸出 T 端 5' 上游含 *Eco* R I 酶切位点的特性, 用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Eco* R I (Promega 公司)酶切做初步鉴定, 并将构建好的重组体命名为 pGEM-MCP-1 和 pGEM-Gro α , 送上海博亚试剂公司测序.

1.2.3 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达载体的构建 质粒提取、酶切、连接、感受态细胞的制备及转化等常规实验技术按《分子克隆实验指南》相关章节进行. 简要步骤: 先将 pGEM-MCP-1 和 pGEM-Gro α 重组体用 *Bam* H I 和 *Eco* R I 限制性内切酶双酶切, 然后切胶回收酶切产物. 再将 pcDNA3.1(+)-空载体用 *Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切, 并切胶回收酶切产物. 按照载体和目的基因摩尔比 1:6 的比例 T₄ 连接酶(Promega 公司)16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 DH5 α 感受态细菌, 培养观察. 将克隆成功的重组质粒命名为 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α . 随机挑取转化成功菌落, 并抽提质粒进行双酶切鉴定. 将鉴定含有插入目的基因的阳性克隆送上海博亚公司测序鉴定.

2 结果

2.1 蛙皮素和牛磺胆酸快速诱发大鼠急性胰腺炎 给予实验动物高剂量蛙皮素和逆行性牛磺胆酸注射, 导致胰腺组织破坏, 造模后 1 h 内可见腺泡细胞破坏, 3-4 h 后更明显, 并可见组织水肿, 这表明两种急性胰腺炎模型均已成功建立.

2.2 MCP-1 和 Gro α 基因目的片段的扩增和 TA 克隆双酶切鉴定结果 对照 DNA 相对分子质量标准, 分别扩增出的约 544 bp 和 446 bp, 与预计片段大小相同(图 1). PCR 产物经纯化回收后与 pGEM-T easy 载体连接, 转化 DH5 α 挑取阳性菌落, 将质粒纯化后经双酶切鉴定重组体. 紧邻 pGEM-T easy 载体克隆位点上下游约 10 bp 处各有一个 *Eco* R I 酶切位点, *Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切 pGEM-MCP-1 重组体产生 3.0 kb 及约 550 bp DNA 片段者为阳性克隆, pGEM-Gro α 重组体经双酶切后产生 3.0 Kb 及约 450 bp 两特异性条带(图 2).

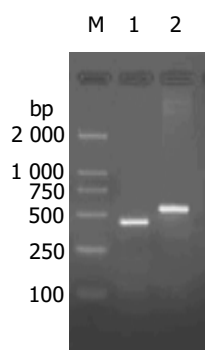


图1 MCP-1和Gro α PCR扩增结果. M: marker DL-2000; 1:Gro α ; 2: MCP-1.

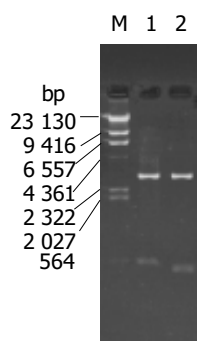


图2 重组体 pGEM-MCP-1 和 pGEM-Gro α 的双酶切鉴定. M: λ - Hind III digest; 1: pGEM-MCP-1/BamH I, EcoR I; 2: pGEM-Gro α /BamH I, EcoR I.

2.3 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达载体构建的双酶切及 PCR 鉴定 将重组体 pGEM-MCP-1 和 pGEM-Gro α 双酶切后, 用琼脂糖凝胶电泳回收 MCP-1 片段和 Gro α , 与同样经 BamH I 和 EcoR I 双酶切真核表达载体 pcDNA3.1(+) 进行体外连接反应, 并对转化成功后的阳性重组体经 BamH I 和 EcoR I 双酶切电泳鉴定, 结果重组体 pcDNA3.1(+)-MCP-1 产生 5.4 kb 及 550 bp 两个特异性条带, 而 pcDNA3.1(+)-Gro α 产生 5.4 kb 及 450 bp 两个特异性条带(图 3). PCR 鉴定以 pcDNA3.1(+)-MCP-1 为模板, 用 MCP-1 上下游引物扩增出 544 bp 的产物, pcDNA3.1(+)-Gro α 为模板, 用 Gro α 上下游引物扩增出 446 bp 的产物, 而以 pcDNA3.1(+) 为模板者未能扩增出相应产物(图 3).

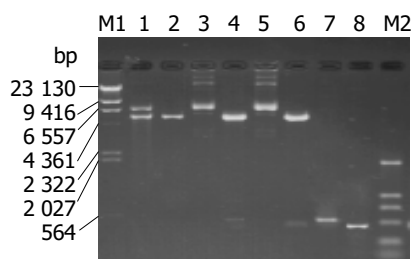


图3 重组体 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 的双酶切鉴定及 PCR 鉴定. M1: λ - Hind III digest; 1: pcDNA3.1(+); 2: pcDNA3.1(+)/BamH I, EcoR I; 3: pcDNA3.1(+)-MCP-1; 4: pcDNA3.1(+)-MCP-1/BamH I, EcoR I; 5: pcDnNA3.1(+)-Gro α ; 6: pcDNA3.1(+)-Gro α /BamH I, EcoR I; 7: MCP-1 target gene; 8: Gro α target gene; M2: marker DL-2000.

2.4 测序鉴定 真核表达重组质粒 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 经上海博亚生物技术公司测序分析, 目的基因片段 MCP-1 测序结果与基因库 AF058786(Rattus norvegicus JE/MCP-1 mRNA, complete cds)完全一致, 目的基因 Gro α 测序结果与基因库 NM_030845(Rattus norvegicus gro)nt92-nt94 序列不同, 测得序列为 CTG, 而 GenBank 中序列为 TGC, 经重复多次实验及多次测序, 均为此结果, GeneBank 中 NM_030845 nt21-nt23 序列有误.

3 讨论

急性胰腺炎关键的启动因素是腺泡细胞内胰酶活化导致胰腺自身消化^[12-14]. 而腺泡细胞接受刺激后可分泌大量的炎性因子并促进炎性细胞浸润, 导致局部炎症反应. 细胞因子及其他化学性炎症递质活化、释出进入血液循环, 形成全身炎症反应. 因此, 炎症递质在胰腺炎及随后的全身炎症反应的发病机制中起重要作用. 我们对实验性急性胰腺炎的基因芯片研究也表明: 趋化因子在腺泡损伤后短时间内即可表达增高, 可能是最早引导白细胞移向胰腺损伤区域的关键刺激, 而不同的趋化因子对不同的白细胞亚群具有趋化和活化效应.

趋化因子是一族小分子(8-10 ku)、可诱导、分泌性的细胞因子, 按结构分为 CXC 和 CC 亚族, CXC 趋化因子可以进一步分为两组, 一组包含保守的氨基酸序列 ELR, 另一组没有此结构单元. 包含 ELR 结构单元的 CXC 趋化因子, 包括几种中性粒细胞趋化因子和激活因子, 如 GRO- α 、IL8 和巨噬细胞炎症蛋白 2 (MIP2), 而缺乏 ELR 结构单元者很少有中性粒细胞激活活性. CC 趋化因子可趋化单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和树突状细胞, 如单核细胞趋化蛋白 1(MCP1), 主要作用于单核细胞. 趋化因子受体属视紫红质超家族, 跨膜与 G 蛋白耦联, 配受体结合使细胞内钙浓度升高和蛋白激酶 C 活化.

急性胰腺炎时胰腺局部损伤和由局部损伤到全身炎症反应的发展中, 中性粒细胞起到重要作用. 多篇文献报道: 应用抗中性粒细胞抗体对抗血液循环中的中性粒细胞可减轻实验性急性胰腺炎的胰腺损伤并保护肺部不受损伤^[15-17]. 在多种炎症损伤动物模型中, GRO- α 可诱导中性粒细胞聚集, 对 GRO- α 特异性拮抗可减轻炎症反应^[18-21]. 因此, GRO- α 可能成为急性胰腺炎的治疗靶点.

Grady *et al*^[5]应用 mRNA 差异显示、Northern blotting 分析和免疫荧光等方法在体内、体外实验中均证明: 腺泡细胞表达趋化因子 MCP1 是急性胰腺炎发病中的早期事件. Brady *et al*^[22]的研究表明, 经给予过量蛙皮素或逆行性胆胰管注射胆盐诱导的大鼠实验性急性胰腺炎中, 造模后 1 h 即可检测到胰腺组织的 GRO- α 和 MCP1 mRNA 表达, 表明 GRO- α 和 MCP1 是急性胰腺炎中的早期炎症递质. 我们的基因芯片研究也证实了这

一点,因此,趋化因子 GRO- α 和 MCP1 可能成为急性胰腺炎中抗炎治疗的理想靶点。Sckido *et al*^[23] 研究表明,用阻断抗体或受体拮抗剂中和 IL-8 的作用可以减轻局部和全身炎症反应。DNA 疫苗作为一种新型疫苗已引起人们广泛的注意。DNA 疫苗在宿主细胞内表达目的抗原,抗原经与自然感染相似的过程加工、修饰后,可直接与 MHC I 类和 II 类分子结合,引发特异性的细胞免疫和体液免疫。与传统疫苗相比,DNA 疫苗易于构建,没有减毒病原体可能在体内复制致病的危险,且可根据分子生物学和免疫学原理改良抗原,以降低致病性或改变抗原性^[24-30]。我们成功构建了针对大鼠的真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 。pcDNA3.1(+)-质粒含有人类巨细胞病毒(CMV)的高效启动子和增强子,是一种外源基因在哺乳动物细胞中高效表达及研制 DNA 疫苗的理想载体。本研究为进一步明确急性胰腺炎早期分子机制和探索其基因治疗打下了实验基础。并且我们在实验中意外发现: Genbank 中 NM_030845 nt21-nt23 序列有误。

4 参考文献

- Lerch MM, Gorelick FS. Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Med Clin North Am* 2000;84:549-563
- Steer LM. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Ital Chir* 1995;66:159-163
- Steer ML, Meldolesi J. Pathogenesis of acute pancreatitis. *Annu Rev Med* 1988;39:95-105
- Bhatia M, Brady M, Kang YK, Costello E, Newton DJ, Christmas SE, Neoptolemos JP, Slavin J. MCP-1 but not CINC synthesis is increased in rat pancreatic acini in response to cerulein hyperstimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G77-G85
- Grady T, Liang P, Ernst SA, Logsdon CD. Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;113:1966-1975
- Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1197-G1208
- Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* 2002;122:448-457
- Cook JW, Karakozis S, Kim D, Provido H, Gongora E, Kirkpatrick JR. Interleukin-10 attenuates proinflammatory cytokine production and improves survival in lethal pancreatitis. *Am Surg* 2001;67:237-241
- Kim H, Seo JY, Roh KH, Lim JW, Kim KH. Suppression of NF-kappaB activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med* 2000;29:674-683
- Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 1):G1402-G1414
- Satoh A, Shimosegawa T, Fujita M, Kimura K, Masamune A, Koizumi M, Toyota T. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation improves the survival of rats with taurocholate pancreatitis. *Gut* 1999;44:253-258
- Grady T, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM, Gorelick FS. Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am J Physiol* 1998;275(5 Pt 1):G1010-G1017
- Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, Petersen O. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13126-13131
- Yang BM, Demaine AG, Kingsnorth A. Chemokines MCP-1 and RANTES in isolated rat pancreatic acinar cells treated with CCK and ethanol in vitro. *Pancreas* 2000;21:22-31
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2154-2163
- Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, Lee HS, Frossard JL, Steer ML. The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasive model of acute pancreatitis-associated lung injury. *Int J Pancreatol* 1998;24:77-83
- Murakami H, Itoh K, Itoh T, Harada A, Nonami T, Takagi H. Anti-neutrophil antibody attenuates the severity of acute lung injury in rats with experimental acute pancreatitis. *Arch Surg* 1995;130:93-98
- Hirasawa N, Watanabe M, Mue S, Watanabe K, Tsurufuji S, Ohuchi K. Induction of neutrophil infiltration by rat chemotactic cytokine (CINC) and its inhibition by dexamethasone in rats. *Inflammation* 1992;16:187-196
- Yamasawa H, Ishii Y, Kitamura S. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant in a rat model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Inflammation* 1999;23:263-274
- Liu YY, Watanabe K, Miyasaka M, Tsurufuji S, Tsuchiya M. Rat CINC/gro: a novel mediator for locomotive and secretagogue activation of neutrophils in vivo. *J Leukoc Biol* 1994;55:652-657
- Davenpeck KL, Zagorski J, Schleimer RP, Bochner BS. Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines. *J Immunol* 1998;161:6861-6870
- Brady M, Bhatia M, Zagorski J. CINC and MCP-1 expression in early acute pancreatitis (Abstract). *Pancreas* 1999;19:416
- Sckido N, Mukaido N, Harada A. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin 8. *Nature* 1993;365:654-657
- McDonnell WM, Askari FK. DNA vaccines. *N Eng J Med* 1996;334:42-45
- 孙波, 何苗, 杨骅, 金晶, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 杜奕奇, 李兆申. 携带幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白活减毒鼠伤寒沙门菌口服重组 DNA 疫苗株的构建. *世界华人消化杂志* 2004;12:1317-1320
- 聂青和. 基因疫苗的基础研究及应用现状. *世界华人消化杂志* 2003;11:125-129
- 孙利, 周永兴, 郝春秋, 冯志华, 赵君, 胡沛臻, 付勇, 马福成, 常吉庆, 王九平, 聂青和. DNA 疫苗对小鼠 HCV-C 皮下移植瘤的防治. *世界华人消化杂志* 2003;11:165-168
- 杜德伟, 周永兴, 冯志华, 姚志强, 李光玉. IL-12 及 HBV 基因疫苗共同免疫小鼠的效果. *世界华人消化杂志* 2000;8:128-130
- 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2b 小鼠免疫应答的实验研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:137-140
- 王全楚, 周永兴, 姚志强, 冯志华. 不同载体及靶基因对乙型肝炎病毒 DNA 疫苗免疫效果的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:289-291

逆转录病毒载体介导反义 K-*ras* 基因治疗胰腺癌的实验研究

蒋奎荣, 刘训良, 苗毅, 卢春, 戴存才, 徐泽宽, 钱祝银

蒋奎荣, 刘训良, 苗毅, 戴存才, 徐泽宽, 钱祝银, 南京医科大学第一附属医院胆胰外科 江苏南京市 210029
卢春, 南京医科大学免疫学与微生物学系 江苏省南京市 210029
蒋奎荣, 男, 1973-02-18 生, 江苏省镇江市人, 汉族, 主治医师, 2001 年南京医科大学博士研究生, 主要从事胰腺癌分子生物学方面研究。
南京医科大学创新基金项目, No. CX2003014
项目负责人: 苗毅, 210029, 江苏省南京市广州路 300 号, 南京医科大学第一附属医院胆胰外科. miaoyi@njmu.edu.cn
电话: 025-83718836-6508
收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-04

Therapeutic effects of recombinant retrovirus mediated antisense K-*ras* gene on pancreatic cancer

Kui-Rong Jiang, Xun-Liang Liu, Yi Miao, Chun Lu, Cun-Cai Dai, Ze-Kuan Xu, Zhu-Yin Qian

Kui-Rong Jiang, Xun-Liang Liu, Yi Miao, Cun-Cai Dai, Ze-Kuan Xu, Zhu-Yin Qian, Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210019, Jiangsu Province, China
Chun Lu, Department of Immunology and Microbiology, Nanjing Medical University, Nanjing 210019, Jiangsu Province, China
Supported by the Innovation Foundation of Nanjing Medical University, No. CX2003014
Correspondence to: Dr. Miao Yi, Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province China. miaoyi@njmu.edu.cn
Received: 2004-08-17 Accepted: 2004-09-04

Abstract

AIM: To isolate and clone antisense K-*ras* gene fragments and to clarify its effect on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells and expression of K-*ras* mRNA and p21 protein.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify K-*ras* gene exon 1 and 4 as well as the flanking sequences, taking pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 and PC-3 genomic DNA as the template. The target gene was cloned into retroviral vector pLXSN to construct the recombinant plasmid. After packaged in PT-67 cells the retrovirus was obtained. Then BxPC-3 and PC-3 cells were transfected with the recombinant retrovirus. Proliferation, apoptosis of pancreatic carcinoma cells and the expression of p21 protein were detected by MTT, flow cytometry and immunohistochemistry respectively. The therapeutic effect of retrovirus on hepatocellular carcinoma was observed in mice.

RESULTS: The antisense K-*ras* gene was successfully cloned into the vector pLXSN. Proliferation of PC-3 cells was significantly inhibited at day 1, 2, 3, 4, and 5 after transfected

with pLXSN-AS-exon1/4B, compared with that of non-transfected cells and pLXSN-transfected group ($F = 4.716$, $P < 0.05$; $F = 6.914$, $P < 0.05$; $F = 15.115$, $P < 0.05$; $F = 16.883$, $P < 0.05$; $F = 15.134$, $P < 0.05$; respectively). BxPC-3 showed no significant difference among different groups. Expression of K-*ras* mRNA and p21 protein in PC-3 cells obviously decreased while those in BxPC-3 cells not so obviously. Apoptotic rates of PC-3 cells transfected with pLXSN-AS-exon1 and pLXSN-AS-exon4B were significantly higher than those with pLXSN and non-transfection (10.28%, 6.7% vs 2.86%, 3.24%; $P < 0.01$). Apoptosis of BxPC-3 cells were not significant among different groups. The size of hepatocellular carcinoma significantly decreased after treated with pLXSN-AS-exon1 and pLXSN-AS-exon4B, compared with that treated with pLXSN (0.32 ± 0.09 g, 0.352 ± 0.05 g vs 0.60 ± 0.09 g; $P < 0.01$).

CONCLUSION: The retrovirus-mediated antisense K-*ras* gene can inhibit proliferation and induce apoptosis of pancreatic carcinoma cells. The mechanism may relate to down-regulating expression of K-*ras* mRNA and p21 protein.

Jiang KR, Liu XL, Miao Y, Lu C, Dai CC, Xu ZK, Qian ZY. Therapeutic effects of recombinant retrovirus mediated antisense K-*ras* gene on pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2627-2632

摘要

目的: 分离及克隆胰腺癌细胞基因组中 K-*ras* 基因片段, 构建含反义 K-*ras* 癌基因逆转录病毒载体并探讨其对胰腺癌细胞增生、凋亡的影响及可能的分子机制。

方法: 设计 2 对 PCR 引物, 分别在上下游引物中引进 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点, 以胰腺癌细胞株 BxPC-3、PC-3 基因组 DNA 为模板扩增 K-*ras* 基因外显子 1、4 及侧翼序列, 将目的基因克隆入逆转录病毒载体 pLXSN 中, 构建重组质粒, 经 PT-67 细胞包装后获得重组逆转录病毒。将该重组逆转录病毒转染上述细胞, 经 G418 筛选获得稳定细胞, 应用 MTT、流式细胞仪和免疫组化法分别研究其增生、凋亡和对胰腺癌 p21 蛋白表达; 建立胰腺癌裸鼠移植瘤模型, 观察反义 K-*ras* 基因体内治疗效果。

结果: 成功构建含反义 K-*ras* 基因的重组逆转录病毒载体。反义 K-*ras* 基因抑制胰腺癌细胞增生, 诱导细胞凋亡、下调 K-*ras* mRNA 和 P21 蛋白表达, 并抑制裸鼠胰腺癌移植瘤的生长。

结论: 反义 K-*ras* 基因可使胰腺癌细胞增生受到抑制, 并

可诱导细胞凋亡和下调K-*ras*mRNA和P21蛋白表达.

蒋奎荣, 刘川良, 苗毅, 卢春, 戴存才, 徐泽宽, 钱祝银. 逆转录病毒载体介导反义K-*ras*基因治疗胰腺癌的实验研究. 世界华人消化杂志 2004;12(11): 2627-2632

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2627.asp>

0 引言

肿瘤是多基因改变的结果. 包括癌基因激活, 抑癌基因失活等. Ras 癌基因在细胞分化和信号转导过程中等中扮演着重要的角色^[1-2]. 由点突变导致 *ras* 激活后改变 GAP 与 GTP 的结合和 GTP 酶的活性从而影响合成 GDP 过程, 使传递到细胞内的效应器的信号刺激延长, 从而刺激细胞生长, 抑制上皮细胞分化而致癌^[3-4]. K-*ras* 基因在多种恶性肿瘤中均有突变, 但突变率不及 50%^[2-6], 而以胰腺癌为最高, 可达 75-100% 以上^[7-13], 是胰腺癌基因治疗非常理想的靶点之一. 我们通过含反义K-*ras* 癌基因重组逆转录病毒转染胰腺癌细胞BxPC-3和PC-3, 并进行动物实验, 探讨其对胰腺癌p21 蛋白表达、细胞增生和凋亡的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 BxPC-3和PC-3胰腺癌细胞株分别购于中国科学院上海生化细胞所和北京协和医院病理科; PM1640, DMEM 为 Gibco 公司产品; 胎牛血清(FBS)由浦东开发区农场生产. Wizard Genomic DNA Purification Kit 为 Promega 公司产品; 长链 Taq 酶及 DL2000 Marker 购自大连 Takara 公司, λ DNA *EcoRI*+*Hind* III Marker 购自 MBI 公司. 琼脂糖凝胶片段回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; NIH3T3, PT67 细胞、逆转录病毒载体 pLXSN、大肠杆菌 DH5 α 由南京医科大学微生物学与免疫学系保存; T₄ 连接酶及限制性内切酶 *EcoRI*, *Bam*HI 和核糖核酸酶(RNase)均购自南京生兴生物有限公司; Superfect Transfection Reagent 转染试剂盒由美国 Qiagen 公司提供; 聚凝胺(polybrene), MTT 由 Amerasco 公司生产; Tripue 为罗氏公司产品; K-*ras*mAb 源于 Merck 公司; SABC 试剂盒由武汉博士德生物有限公司生产; Balb/c 裸鼠来源上

海中科院动物中心, 为 4-6 周龄, 体重 18-22 g; 所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成(表 1).

1.2 方法 胰腺癌细胞株 BxPC-3 和 PC-3 培养在 37 °C, 50 mL/L CO₂ 孵箱中. 培养液为含 100 mL/L FBS 的 RPMI1640, PT-67 和 NIH3T3 细胞培养液为含 100 mL/L FBS 的 DMEM, 每 2-3 d 换液, 细胞长满 80% 时, 2.5 g/L 胰酶消化传代. 取生长良好胰腺癌细胞约 5×10^6 个, 应用 Wizard Genomic DNA Purification Kit 并按厂家推荐使用说明书进行 DNA 的抽提. DNA 以 TE 液溶解后置 4 °C 备用. 反义序列 1 和 2 PCR 扩增反应体系: ddH₂O 10.5 μ L, 引物各 1.5 μ L (5 pmol/L), dNTPs 1.5 μ L (2 mmol/L), MgCl₂ 1.5 μ L (25 mmol/L), 10 \times Buffer 2.0 μ L, 基因组 DNA 1.0 μ L, Taq 酶 0.1 μ L, 最后加石蜡油 50 μ L. PCR 反应条件: 94 °C 8 min \times 1 cycle; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min \times 30 cycles; 72 °C 8 min \times 1 cycle. 所用仪器为 Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480 型 PCR 仪. *Bam*HI 和 *EcoRI* 双酶切 pLXSN 和 PCR 扩增目的基因, 将纯化的双酶切 PCR 产物和 pLXSN 线性载体以 2:1 摩尔比例混合, 加入 T₄ DNA 连接酶, 于 16 °C 反应 10 h. 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α (氯化钙法), 铺于含氨苄青霉素 LB 平板后在 37 °C 温箱中过夜. 次日, 挑取单克隆菌加入 LB 液 3 mL, 震荡培养 (200 r/min) 10 h, 抽提质粒作双酶切和序列分析鉴定. 接种 PT67 于 6 孔板中, 待细胞生长约 80% 满时, 吸去培养液, PBS 洗涤, 将 DNA 10 μ L, 无血清 DMEM 90 μ L 混匀并离心后, 加入 Superfect Transfection Reagent 10 μ L, 加入含血清 DMEM 600 μ L, 轻柔混匀, 立即均匀加入 PT67 细胞中, 37 °C 50 mL/L CO₂ 孵育 3 h, PBS 洗 4 次, 加入新鲜的完全培养基, 24 h 后换液, 48 h 后细胞按 1:5 传代, 72 h 后加入 G418 200 g/L 筛选培养 14 d, 将抗性细胞接种于 6 孔培养板, 扩大培养. 待细胞生长至 70-80% 满时更换半量新鲜培养液, 32 °C 50 mL/L CO₂ 孵育 48 h 后收集上清, 以 0.45 μ m 滤膜过滤后 -70 °C 保存. 病毒上清分别命名为 pLXSN-AS-exon1 和 pLXSN-AS-exon4B. 将对数生长期的 NIH3T3 细胞接种于 6 孔培养板, 每孔 1×10^5 细胞.

表 1 合成的引物序列

名称	引物序列	产物长度
反义序列 1(exon1 及侧翼序列)	上游: 5' -CTC <u>GAA TTC</u> ACT GGT GGA GTA GAT AG-3'	294 bp
	下游: 5' -CTC <u>GGA TCC</u> GGT CAG AGA AAC CTT TAT CTG-3'	
反义序列 2(exon4B 及侧翼序列)	上游: 5' -CTC <u>GAA TTC</u> CAG TTG CCT GAA GAG CAT A-3'	558 bp
	下游: 5' -CTC <u>GGA TCC</u> CAA CAT TCA CAC TTG GTA AGA-3'	
RT-PCR	上游: 5' -CTC <u>GGA TCC</u> GTC CTA ATA TAT GTA ATA TAT-3'	579 bp
	下游: 5' -CTC <u>GAA TTC</u> CAT TAA GTT TCA CAC CAA CAT-3'	
β -actin	上游: 5' -TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3'	661 bp
	下游: 5' -CTA GAA GCA GCG GTG GAC GAT GGA-3'	

下划线部分为引入的限制性酶切位点.

培养 12 h, 将收集的病毒上清 10 倍系列稀释, 每孔加入 1 mL 系列稀释病毒上清和终浓度为 8 mg/L 的 polybrene 进行感染, 6 h 后补加 1 mL 完全培养基, 48 h 后加 G418 (200 g/L), 维持浓度, 14 d 后根据稀释倍数和出现的抗性细胞克隆数计算病毒滴度。

将重组 pLXSN-AS-exon1/exon4B 病毒和 pLXSN 病毒分别感染 BxPC-3 和 PC-3, 同时加入终浓度为 8 mg/L 的 polybrene, 32 °C 1 000 r/min 离心 30 min 促进病毒感染。6 h 后更换新鲜培养液, 24 h 重复 1 次, 48 h 加入 G418 筛选 14 d, 扩大培养抗性克隆。

1.2.1 MTT 检测细胞增生 将 1×10^4 细胞接种于 96 孔板中, 分别于培养 24, 48, 72, 96, 120 h 后加入 MTT (5 g/L) 20 μ L/孔, 孵育 4 h, 弃去培养基, 加 DMSO 180 μ L, 振荡 10 min 使其完全溶解, 在酶联免疫检测仪 490 nm 波长测定吸光度 *A* 值。

1.2.2 K-ras mRNA 和 P21 蛋白表达分析 按 Tripue 说明书进行转染反义 K-ras 基因前后胰腺癌细胞总 RNA 抽提。简要步骤如下: Tripue 1 mL 反复吹吸细胞, 加入氯仿振荡, 转移上清后加入异丙醇沉淀 RNA, 750 mL/L 乙醇洗涤 RNA, 再以三蒸水 20 μ L 溶解 RNA 沉淀。各取 RNA 4 μ L, 70 °C 水浴 10 min, 迅速置于冰上, 补足反应体系, 42 °C 水浴 90 min 进行反转录, 95 °C 水浴 5 min, 冰浴 5 min, 冻存于 -70 °C。以 cDNA 为模板进行 PCR 并以 β -actin 为内参同时进行扩增。 β -actin PCR 扩增条件退火温度为 56 °C, 其余同前。所用试剂和实验用品均经 DEPC 处理。常规消化 BxPC-3 和 PC-3 细胞, 完全培养基悬浮细胞后滴于玻片上, 培养 2 h, 加入完全培养基, 12 h 后细胞贴壁, 取出玻片按照博士德 SABC 免疫组化试剂盒说明书进行 IHC 操作。

1.2.3 细胞凋亡检测 取 BxPC-3 和 PC-3 细胞及转染反义 K-ras 基因后筛选出的抗性细胞约 1×10^6 , 常规消化、离心, 重悬于 4 °C 700 mL/L 乙醇中, 进行溴化丙锭染色, 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡情况。

1.2.4 裸鼠皮下移植瘤模型体内实验 取 4-6 周龄 Balb/c 裸鼠, 体重 18-22 g, 共 24 只, 随机分成 6 组, 各分为转染 pLXSN-AS-exon1 组、pLXSN-AS-exon4B 组和 pLXSN 组, 每组 4 只。取对数生长期 BxPC-3 和 PC-3 细胞 1×10^7 个, 接种于于裸鼠颈背部。治疗组于接种后 3 d 后于肿瘤接种皮下部位注射重组逆转录病毒 200 μ L, 对照组以 pLXSN 作为对照。6 wk 后处死后分离肿瘤组织称重。用游标卡尺测量肿瘤长宽高 (*l*, *b*, *h*)。用公式 $V = l b h \pi / 6$ 计算肿瘤体积。

统计学处理 采用 Student-Newman-Keuls 检验和 χ^2 检验, 数据以 SPSS12.0 软件包处理。

2 结果

重组反义 K-ras 癌基因逆转录病毒载体 目的片段 PCR 扩增结果(图 1)。挑取单个克隆菌落, 加入含氨苄青霉素的 LB 培养液 3 mL 中, 于 37 °C 振荡培养 10 h, 提

取质粒 DNA, 经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切电泳后, 可见两个清晰的条带, 大小与预期一致(图 2)。应用通用引物对重组质粒进行测序。鉴定结果显示目的基因的 DNA 序列与预期的相同。结果经 BLAST 比对后完全一致(图 3, 4)。其中 PC-3 细胞有第 12 密码子突变(GGT→GTT)。重组质粒 pLXSN-AS-exon1/exon4B 和 pLXSN 以 Superfect Transfection Reagent 转染 PT67 细胞, 同时设立无质粒的空白对照转化组, 48 h 后细胞 1:5 传代, 72 h 后加 G418 200 mg/L 筛选培养 14 d, 扩大培养抗性克隆。将抗性细胞接种于 6 孔培养板, 待细胞生长至 70-80% 满时更换半量新鲜培养液, 32 °C 5% CO₂ 孵育 48 h 后收集上清, 以 0.45 μ m 滤膜过滤后冻于 -70 °C 保存。收集的病毒上清 10 倍系列稀释感染对数生长期的 NIH3T3 细胞, G418 筛选 14 d 后根据稀释倍数和出现的抗性细胞克隆数计算病毒滴度。结果含 pLXSN 的重组逆转录病毒滴度为 3×10^9 CFU/L, 含 pLXSN-AS-exon1/exon4B 重组逆转录病毒滴度分别为 $2, 3 \times 10^8$ CFU/L。

2.1 细胞增生抑制结果 每组数据采用 8 个复孔, 连续观察 5 d。PC-3 细胞 MTT 结果见生长曲线(图 5)。BxPC-3 细胞 MTT 结果见生长曲线(图 6)。PC-3 细胞转染 pLXSN-AS-exon1/4B 组与未转染组和转染 pLXSN 组在第 1 d ($F = 4.716$, $P < 0.05$), 第 2 d ($F = 6.914$, $P < 0.05$), 第 3 d ($F = 15.118$, $P < 0.05$), 第 4 d ($F = 16.883$, $P < 0.05$), 第 5 d ($F = 15.134$, $P < 0.05$) 相比, 其差异均有显著性意义; 未转染组和转染 pLXSN 组相比、pLXSN-AS-exon1 与 pLXSN-AS-exon4B 组相比无显著性差异; 而 BxPC-3 细胞各组间均无显著性差异。

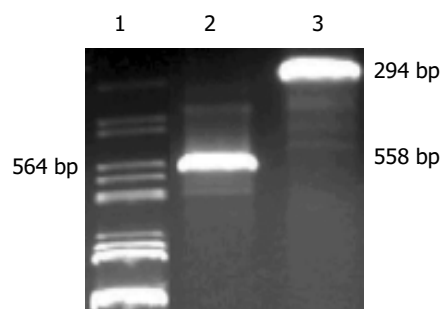


图 1 PCR 扩增目的片段。1: Marker(λ DNA *Eco*RI/*Hind* III); 2: exon1 及侧翼序列, 294 bp; 3: exon4B 及侧翼序列, 558 bp。

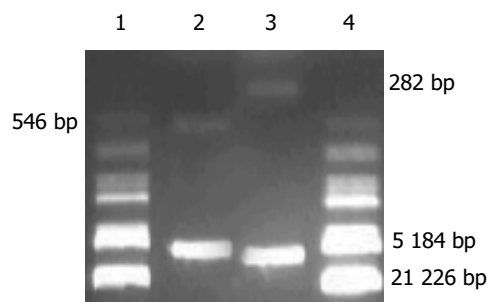


图 2 pLXSN-AS-exon1 和 pLXSN-AS-exon4B 经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切电泳图。1, 4: Marker(λ DNA *Eco*RI/*Hind* III); 2: pLXSN-AS-exon1 双酶切, 282 bp; 3: pLXSN-AS-exon4B 双酶切, 546 bp。

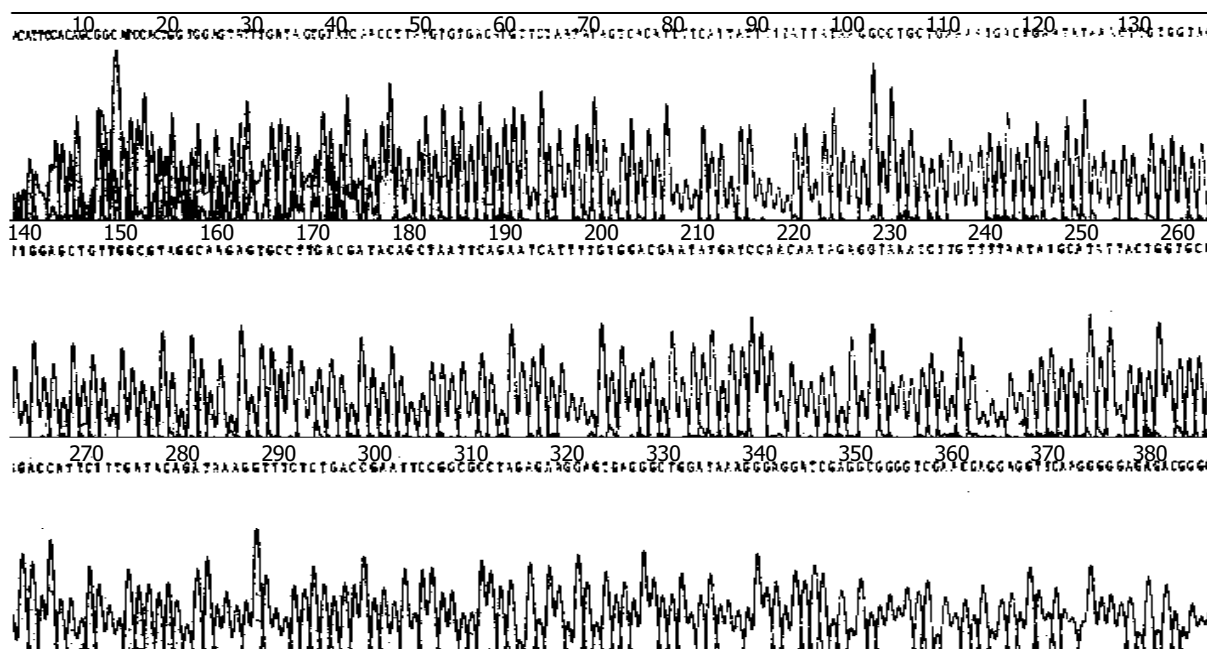


图3 pLXSN-A S-exon1 测序图.

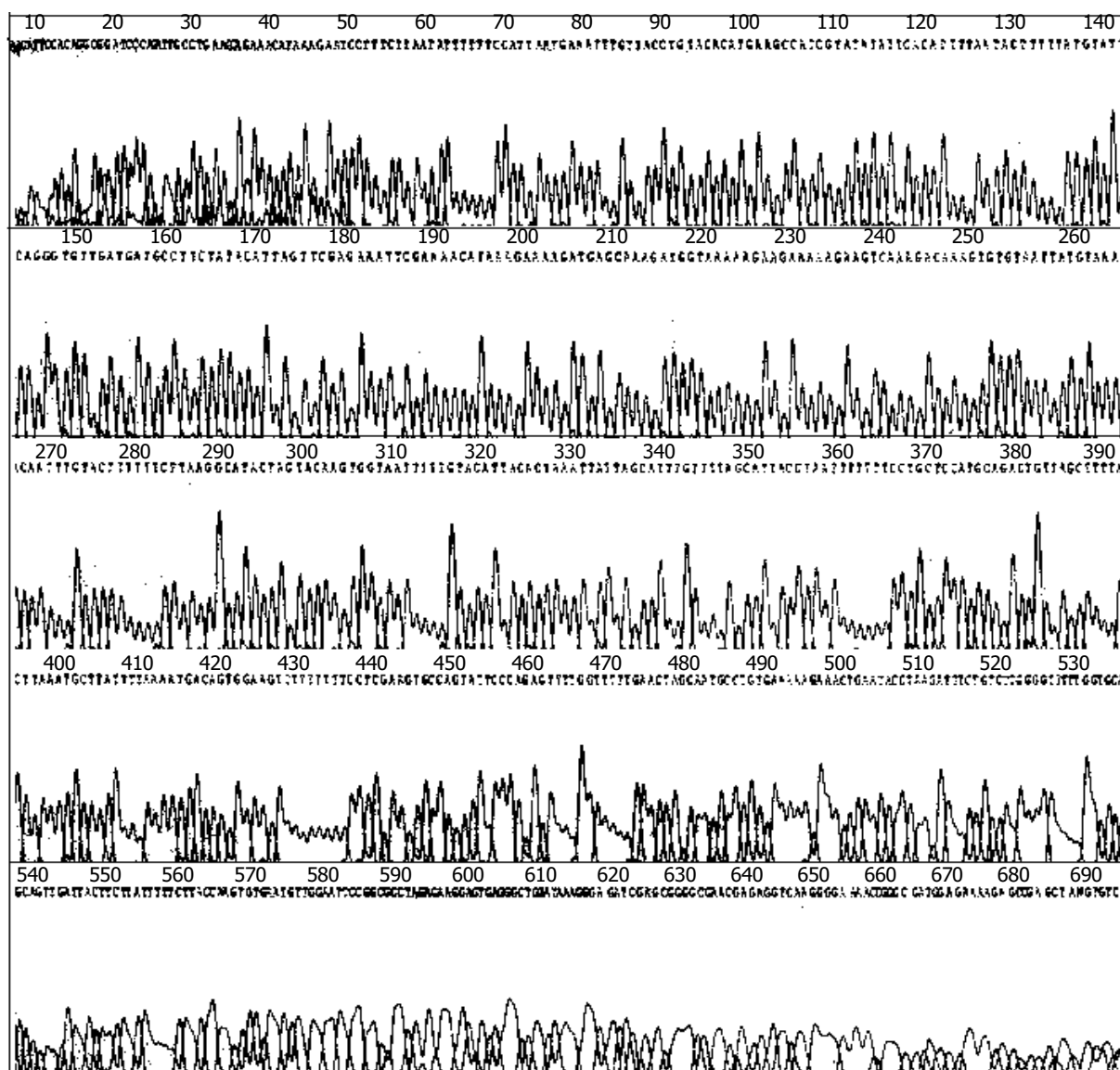


图4 pLXSN-exon4B 测序图.

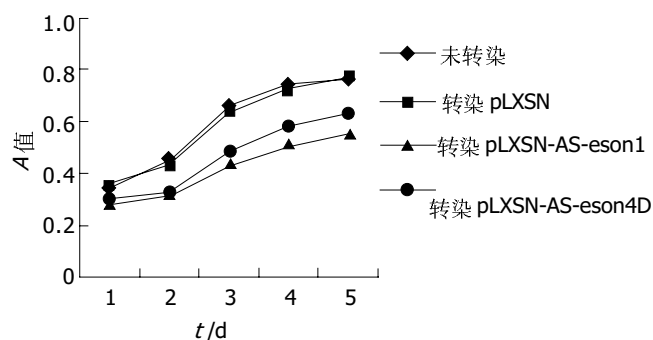


图5 重组逆转录病毒转染PC-3细胞MTT结果.

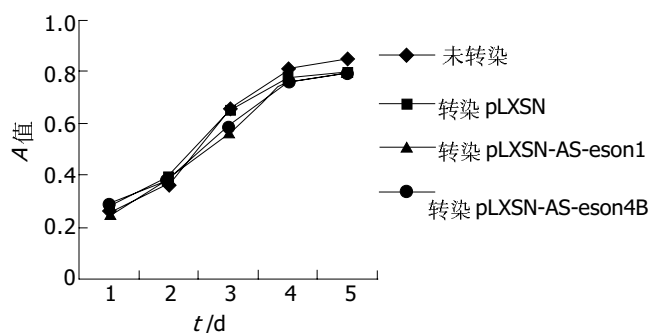
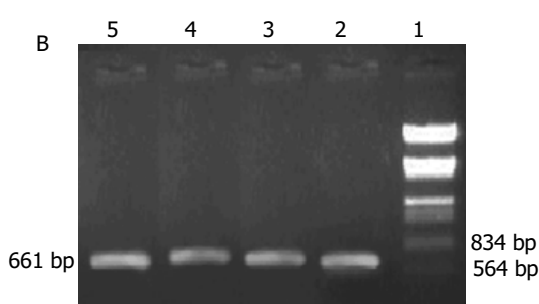
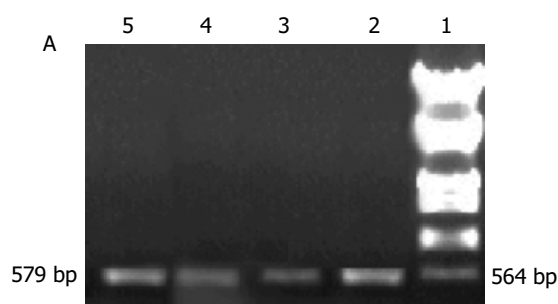
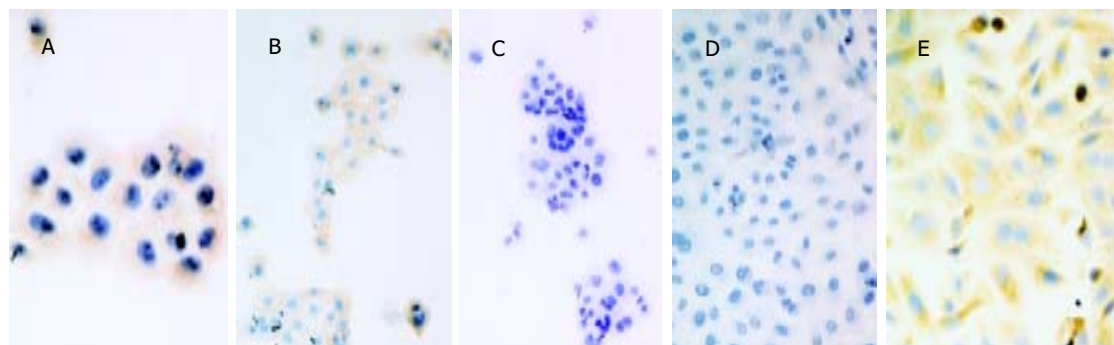


图6 重组逆转录病毒转染BxPC-3细胞MTT结果.

图7 转染pLXSN和重组质粒后K-ras mRNA表达图. A: 转染pLXSN和重组质粒后K-ras mRNA表达图; 1: Marker(λ DNA *EcoRI*/*Hind* III); 2: 转染pLXSN; 3: 转染pLXSN-AS-exon1; 4: pLXSN-AS-exon4B; 5: 未转染PC-3细胞; B: β -actin表达图; 1: Marker(λ DNA *EcoRI*/*Hind* III); 2: 转染pLXSN; 3: 转染pLXSN-AS-exon1; 4: pLXSN-AS-exon4B; 5: 未转染PC-3细胞.图8 P21 表达免疫组织化学图. A: PC-3 细胞, 未转染细胞 $\times 400$, P21 阳性; B: PC-3 细胞, 转染 pLXSN 细胞 $\times 400$, P21 阳性; C: PC-3 细胞, 转染 pLXSN 细胞 $\times 400$, p21 阴性; D: PC-3 细胞, 转染 pLXSN-exon1 细胞 $\times 200$, p21 阴性; E: BxPC-3 细胞, 未转染及转染质粒细胞, p21 蛋白表达均为阳性.

2.2 K-ras mRNA 和 P21 蛋白表达 RT-PCR 显示 PC-3 细胞 K-ras mRNA 表达明显下降, 而 BxPC-3 不如 PC-3 明显(图 7). SABC 法研究 BxPC-3 和 PC-3 细胞在转染反义 K-ras 基因前后的 P21 蛋白表达, 结果显示 PC-3 细胞 P21 蛋白表达明显下降而 BxPC-3 细胞无明显改变(图 8).

2.3 细胞凋亡情况 重组逆转录病毒转染 PC-3 细胞后, PC-3 细胞凋亡较转染前及转染 pLXSN 增加; 而 BxPC-3 无统计学差异(表 2).

表2 转染重组逆转录病毒前后胰腺癌细胞凋亡情况

	未转染	转染pLXSN	pLXSN-AS-exon1	pLXSN-AS-exon4B
凋亡率(PC-3)	3.24%	2.86%	10.28% ^{bb}	6.7% ^{dd}
凋亡率(BxPC-3)	2.68%	4.51%	3.00%	2.54%

$\chi^2 = 393.157$, ^b $P < 0.01$ vs 未转染; $\chi^2 = 448.462$, ^b $P < 0.01$ vs pLXSN; $\chi^2 = 126.737$, ^d $P < 0.01$ vs 未转染; $\chi^2 = 161.986$, ^d $P < 0.01$ vs pLXSN.

2.4 对荷瘤裸鼠的治疗作用 建立胰腺癌PC-3和BxPC-3裸鼠移植瘤模型后, 将重组逆转录病毒各1 mL注入移植瘤局部, 连续3 d, 2 mo后观察肿瘤大小和质量. 具体数据(表3).

表3 PC-3 和 BxPC-3 胰腺癌裸鼠移植瘤模型

指标	pLXSN	pLXSN-AS-exon1	pLXSN-AS-exon4B
肿瘤体积(mm ³)	631.8 \pm 81.5	361.5 \pm 97.7	403.5 \pm 71.6
肿瘤重量(g)	0.60 \pm 0.09	0.32 \pm 0.09 ^b	0.352 \pm 0.05 ^b
肿瘤体积(mm ³)	400.8 \pm 73.3	385.5 \pm 61.7	465 \pm 79.9
肿瘤重量(g)	0.356 \pm 0.07	0.338 \pm 0.09	0.412 \pm 0.07

$F = 15.387$, ^b $P < 0.01$ vs pLXSN.

3 讨论

胰腺癌是危害人类健康的常见恶性肿瘤之一. 由于缺乏

有效的早期诊断和有效的治疗手段, 诊治无突破性进展, 5a生存率总体<5%^[14]. 随着分子生物学的进展, 基因治疗将为胰腺癌患者带来希望. 反义基因治疗以其使用方便、易于大量生产及具有高度特异性等优点, 使其成为基因治疗中的热点. 但并非所有反义K-ras基因片段都可以阻断其蛋白表达, 从而发挥其抑瘤效果. 只有反义核酸与K-ras基因特定位置结合, 才能抑制K-ras基因表达. 这些要求有K-ras基因非翻译区或翻译起始区或剪切区或针对第12密码子的反义序列, 如果是寡核苷酸其长度要 ≥ 17 个碱基^[15-19]. Aoki *et al*^[19-20]采用的是K-ras外显子1-3(不含内含子), 长346 bp. 李和伟 *et al*^[21]采用的序列为外显子4及侧翼序列, 长2.4 kb. 还有人应用外显子2-3及侧翼序列, 长2.2 kb, 结果发现有K-ras基因突变者肿瘤细胞p21, *ras*mRNA表达和肿瘤致瘤能力均下降, 而未突变者不受影响^[22]. 然而上述文献中采用的反义序列较长, 技术上难以操作, 其反义序列往往来源于已构建好的单一重组质粒, 在用于不同肿瘤细胞株治疗时, 由于K-ras基因可能有突变, 因而并不能保证能完全封闭K-ras基因. 鉴于此, 我们采用的策略有几点不同于上述学者. 首先是反义序列直接从所要研究的胰腺癌细胞PC-3和BxPC-3中获得, 在用于实验时能够保证能与K-ras基因完全匹配, 起到最大抑瘤效果, 且长度仅数百个碱基, 易于操作; 其次是选用的序列1同时覆盖了非翻译区、翻译起始区、剪切区和第12密码子四个有效区域, 理论上可能最大程度阻断K-ras基因的表达.

实验结果表明, 质粒构建简便易行, 经重组逆转录病毒转染胰腺癌PC-3后, 细胞增生受到明显抑制(与对照组相比 $P<0.05$); K-ras mRNA和p21蛋白表达下降. 同样在体内实验上, 反复接种部位重组逆转录病毒注射能阻止PC-3细胞肿瘤形成并抑制其生长. 相反, 对BxPC-3细胞却无明显效果. 表明BxPC-3等无K-ras基因突变肿瘤形成的机制上不同于PC-3等有K-ras基因有突变者, 其发生发展可能与K-ras基因无关, 而主要由其他因素参与调控, 其内在的分子机制有待于进一步深入研究.

另外, 我们还发现转染反义K-ras基因后, 体外实验中细胞生长受到抑制, 细胞凋亡明显增加($P<0.05$), 其分子机制尚待进一步研究. Kijima *et al*利用核酶阻断K-ras得到了相似的结果. Su *et al*认为是通过改变Bax/Bcl-2比例实现. 体内实验中, 局部注射重组逆转录病毒后移植瘤生长延缓, 作者分析细胞增生减缓除与下调K-ras mRNA和p21表达外, 还诱导了细胞凋亡有关. 实验中观察到, 反义序列1治疗效果要优于反义序列2, 但统计学上却没有显著性差异说明胰腺癌发生发展是多基因参与调控, K-ras基因只是其中较主要的因素之一.

4 参考文献

- 1 Crowe DL. Overlapping functions of Ras and Rac GTPases in regulating cancer cell proliferation and invasion. *Anticancer Res* 2004;24:593-597
- 2 Monstein HJ, Fransen K, Dimberg J, Soderkvist P. K-ras and B-raf gene mutations are not associated with gastrin- and CCK2-receptor mRNA expression in human colorectal tumour tissues. *Eur J Clin Invest* 2004;34:100-106
- 3 Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, Wu R, Carcangiu ML, Costa J, Tallini G. Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3226-3235
- 4 Gemignani ML, Schlaerth AC, Bogomolny F, Barakat RR, Lin O, Soslow R, Venkatraman E, Boyd J. Role of Kras and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2003;90:378-381
- 5 Perentesis JP, Bhatia S, Boyle E, Shao Y, Shu XO, Steinbuch M, Sather HN, Gaynon P, Kiffmeyer W, Envall-Fox J, Robison LL. RAS oncogene mutations and outcome of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18:685-692
- 6 Okudela K, Hayashi H, Ito T, Yazawa T, Suzuki T, Nakane Y, Sato H, Ishi H, KeQin X, Masuda A, Takahashi T, Kitamura H. K-ras gene mutation enhances motility of immortalized airway cells and lung adenocarcinoma cells via Akt activation: possible contribution to non-invasive expansion of lung adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2004;164:91-100
- 7 Sawabu N, Watanabe H, Yamaguchi Y, Ohtsubo K, Motoo Y. Serum tumor markers and molecular biological diagnosis in pancreatic cancer. *Pancreas* 2004;28:263-267
- 8 Ren YX, Xu GM, Li ZS, Song YG. Detection of point mutation in K-ras oncogene at codon 12 in pancreatic diseases. *World J Gastroenterol* 2004;10:881-884
- 9 Uemura T, Hibi K, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, Okochi O, Nagasaka T, Nakao A. Detection of K-ras mutations in the plasma DNA of pancreatic cancer patients. *J Gastroenterol* 2004;39:56-60
- 10 Ren YX, Xu GM, Li ZS, Song YG. Detection of point mutation in K-ras oncogene at codon 12 in pancreatic diseases. *World J Gastroenterol* 2004;10:881-884
- 11 Mu DQ, Peng YS, Xu QJ. Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J Gastroenterol* 2004;10:471-475
- 12 徐永泉, 刘香, 夏玉亭. 胰腺癌组织c-Ki-ras基因点突变分析. 世界华人消化杂志 2001;9:1329-1330
- 13 周国雄, 李兆申, 许国铭. K-ras 12 密码子点突变在胰腺癌早期诊断中的意义. 世界华人消化杂志 2003;11:74-77
- 14 Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun M J. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003;53:5-26
- 15 Bacon TA, Wickstrom E. Walking along human c-myc mRNA with antisense oligodeoxynucleotides: maximum efficacy at the 5' cap region. *Oncogene Res* 1991;6:13-19
- 16 蔡建庭, 钱可大, 吕俊陞. 反义寡脱氧核苷酸在不同作用时点对人胰腺癌细胞系PaTu8988s作用的影响. 中华消化杂志 2000;20:378-379
- 17 Kita K, Saito S, Morioka CY, Watanabe A. Growth inhibition of human pancreatic cancer cell lines by anti-sense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes. *Int J Cancer* 1999;80:553-558
- 18 Aoki K, Yoshida T, Sugimura T, Terada M. Liposome-mediated in vivo gene transfer of antisense K-ras construct inhibits pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity. *Cancer Res* 1995;55:3810-3816
- 19 Aoki K, Yoshida T, Matsumoto N, Ide H, Sugimura T, Terada M. Suppression of Ki-ras p21 levels leading to growth inhibition of pancreatic cancer cell lines with Ki-ras mutation but not those without Ki-ras mutation. *Mol Carcinog* 1997;20:251-258
- 20 Nakano M, Aoki K, Matsumoto N, Ohnami S, Hatanaka K, Hibi T, Terada M, Yoshida T. Suppression of colorectal cancer growth using an adenovirus vector expressing an antisense K-ras RNA. *Mol Ther* 2001;3:491-499
- 21 李和伟, 王志永, 刘彤华, 陈杰, 崔全才, 高杰. 表达反义Ki-ras逆转录病毒载体对人胰腺癌细胞恶性表型的影响. 中华病理学杂志 1995;24:288-291
- 22 Mukhopadhyay T, Tainsky M, Cavender AC, Roth JA. Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer Res* 1991;51:1744-1748

E-钙黏附素和 β -连环素在胰腺上皮内瘤变和胰腺癌组织中的表达

郑建明, 朱明华, 倪灿荣, 于观贞, 刘晓红, 林万和, 龚志锦

郑建明, 朱明华, 倪灿荣, 于观贞, 刘晓红, 林万和, 龚志锦, 中国人民解放军第二军医大学长海医院病理科 上海市 200433
郑建明, 男, 1962-07-02 生, 江苏淮安市人, 汉族. 1985 年南京铁道医学院本科毕业, 1995 年第二军医大学硕士研究生毕业, 副教授、副主任医师, 主要从事肿瘤病理研究.
长海医院新一轮学科建设计划《胰腺疾病基础与临床研究》基金资助项目, No. 123258
项目负责人: 朱明华, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科. mhzhz@smmu.edu.cn
电话: 021-25070660-603 传真: 021-25074604
收稿日期: 2004-07-23 接受日期: 2004-09-04

E-cadherin and β -catenin expression in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic adenocarcinoma

Jian-Ming Zheng, Ming-Hua Zhu, Can-Rong Ni, Guan-Zhen Yu, Xiao-Hong Liu, Wan-He Lin, Zhi-Jing Gong

Jian-Ming Zheng, Ming-Hua Zhu, Can-Rong Ni, Guan-Zhen Yu, Xiao-Hong Liu, Wan-He Lin, Zhi-Jing Gong, Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Supported by the Fund for New Projects in Changhai Hospital and Subject Constructive Program of Basic and Clinical Research on Pancreatic Diseases, No. 123258
Correspondence to: Ming-Hua Zhu, Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, 174 Changhai Road, Shanghai 200433, China. mhzhz@smmu.edu.cn
Received: 2004-07-23 Accepted: 2004-09-04

Abstract

AIM: To investigate the significance of abnormal E-cadherin (E-Cad) and β -catenin (β -Cat) expression in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and pancreatic adenocarcinoma.

METHODS: One hundred and fifty-six cases of pancreatic samples, which were surgically removed and autopsied in Changhai Hospital from January 2001 to December 2003, were retrospectively studied. Tissue microarray blocks containing 129 PanIN-1A lesions, 104 PanIN-1B lesions, 22 PanIN-2 lesions, 11 PanIN-3 lesions, and 121 cases of pancreatic ductal adenocarcinoma and corresponding para-cancerous tissues were constructed. EnVision method of immunohistochemistry was used to detect the E-Cad and β -Cat expression in the above tissues. The correlation between the abnormal E-Cad, β -Cat expression and clinicopathological parameters was analyzed.

RESULTS: The rate of E-Cad abnormal expression was significantly higher in ductal adenocarcinomas than that in PanIN lesions and normal ducts (64.5% vs 32.3%, 64.5% vs 0%, $P < 0.05$), and the rate of E-Cad abnormal expression

was in significant relation to differentiation, lymph node metastasis and perineural invasion of pancreatic adenocarcinoma ($P < 0.05$). There was remarkably increase of the E-Cad cytoplasmic expression in PanIN lesions and ductal adenocarcinomas compared with that in normal ducts (21.8%, 34.7% vs 1.5%; $P < 0.05$). The rate of β -Cat abnormal expression was found to relate to lymph node metastasis and perineural invasion of pancreatic adenocarcinoma ($P < 0.05$). The expression of β -Cat cytoplasm and/or nucleus was significant in high-grade PanIN lesions (27.3%) and ductal adenocarcinomas (29.8%) compared with those in low grade PanIN lesions and normal ducts (3.0%, 2.3%; $P < 0.05$). There was a positive relationship between the E-Cad and β -Cat expression in PanIN lesions and ductal adenocarcinomas ($P < 0.01$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: There was aberration in the expression of the E-Cad and β -Cat in PanIN lesions and ductal adenocarcinomas, suggesting that E-Cad and β -Cat not only relate to the biological behaviour and prognosis of pancreatic cancer, but also get involved in pancreatic carcinogenesis.

Zheng JM, Zhu MH, Ni CR, Yu GZ, Liu XH, Lin WH, Gong ZJ. E-cadherin and β -catenin expression in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2633-2637

摘要

目的: 探讨胰腺上皮内瘤变PanIN和胰腺癌组织中E-钙黏附素(E-Cad)和 β -连环素(β -Cat)异常表达的意义。

方法: 回顾性研究长海医院2001-01/2003-12间外科切除和同期尸检的156例胰腺标本, 并构建了组织芯片, 其中含有129灶PanIN-1A, 104灶PanIN-1B, 22灶PanIN-2, 11灶PanIN-3和121例导管腺癌和相应癌旁组织. 用EnVision免疫组化技术检测上述病变组织中E-Cad和 β -Cat的表达变化, 并结合临床病理资料进行相关分析。

结果: 导管腺癌中E-Cad异常表达率明显高于PanINs和正常导管(64.5%, 32.3%, 0%), 且与胰腺癌的分化程度、淋巴结转移和神经浸润密切相关($P < 0.05$)。PanINs和导管腺癌中E-Cad胞质表达较正常导管明显增加。 β -Cat的异常表达与胰腺癌淋巴结转移和神经浸润有明显相关性($P < 0.05$)。高级别PanINs和导管腺癌中 β -Cat胞质和胞核的表达率明显高于低级别PanINs和正常导管($P < 0.05$)。PanINs和导管腺癌中E-Cad和 β -Cat表达间呈正相关性($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

结论: 胰腺癌和PanINs中E-Cad和 β -Cat的异常改变提示

他们不仅与胰腺癌的生物学行为和预后有关,而且也参与了胰腺癌的发生。

郑建明, 朱明华, 倪灿荣, 于观贞, 刘晓红, 林万和, 龚志锦. E-钙黏附素和 β -连环素在胰腺上皮内瘤变和胰腺癌组织中的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2633-2637

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2633.asp>

0 引言

E-钙黏附素(epithelial-cadherin, E-Cad)是维持上皮细胞极性和细胞间黏附连接的主要分子,许多恶性上皮肿瘤的侵袭转移与E-Cad表达及功能障碍有关^[1-5]。 β -连环素(β -catenin, β -Cat)是一种多功能蛋白,参与细胞增生、分化的调节。 β -Cat的异常改变与多种肿瘤的发生密切相关^[6-8]。胰腺癌组织中亦存在E-Cad和 β -Cat的异常表达,且与胰腺癌的生物学行为和预后有关^[9-11]。胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN)是新近提出的用来描述胰腺小导管上皮细胞非典型增生至原位癌这一系列癌前病变连续过程的新概念^[12]。PanIN,特别是高级别PanIN,被认为是胰腺癌的癌前病变^[13]。那么在由正常导管上皮→低级别PanIN→高级别PanIN→胰腺癌的过程中E-Cad和 β -Cat的变化如何?目前尚未见相关报道,我们用组织芯片和免疫组化技术比较研究了PanIN和胰腺癌组织中E-Cad和 β -Cat的表达变化,并联系临床病理资料和相关指标进行分析,以探讨其意义。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2003-12我院病理科资料较完整的手术切除及同期尸检获得的胰腺标本250例,复读全部病理切片,根据胰腺上皮内瘤变最新概念和诊断标准^[12],检出PanIN病灶156例,检出率62.4%,包括导管腺癌121例、慢性胰腺炎23例,正常胰腺12例(尸检9例,胰腺外伤1例,脾亢1例,异位1例)。男93例,女63例,年龄30-80(平均58.6岁)。胰腺导管腺癌位于胰头部92例,胰体尾27例,全胰2例。高分化21例,中分化68例,低分化32例。

1.2 方法 组织芯片构建参照Kononen *et al*^[14]方法,应用组织芯片构建仪(Tissue Arrayer, Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA)制备组织芯片。流程:应用构建仪在预先制备的空白蜡块(45 mm × 20 mm)中穿孔(直径2 mm,深度2-3 mm),然后在组织蜡块标记点处穿取组织(直径及深度同上),准确放入空白蜡块的小孔内,依次按序操作,直至完成,并作好记录。然后对制备好的芯片蜡块进行加热处理,使嵌入的组织条与蜡块密切融合。选取典型病变,构建了6张组织芯片(图1),共计899个点,包括不同级别的PanIN病灶、胰腺病变和病变周围正常组织。PanIN病灶共266灶,其中PanIN-1A有129灶, PanIN-1B有104灶, PanIN-2有22灶, PanIN-3有11灶。石蜡切片厚4 μ m,采用

免疫组化EnVision 二步法,兔抗人E-Cad和 β -Cat抗体购置Santa Cruz公司,工作浓度均为1:50,用PBS替代一抗作阴性对照,DAB显色。具体操作流程按说明书进行。以正常胰腺导管上皮作为阳性对照,E-Cad和 β -Cat免疫组化染色根据细胞定位(胞膜、胞质或胞核)、染色强度和分布来决定。染色强度:0分:阴性;1分:弱阳性;2分:强阳性。染色分布:0分:阳性细胞数<10%;1分:阳性细胞数10-50%;2分:阳性细胞数>50%;由二者得分的和来决定染色结果:对于胞膜或胞质来说,0分:阴性(-);2分:弱阳性(\pm);3-4分:强阳性(+).对于胞核来说,0分:阴性(-);2-4分:阳性(+).将正常胰腺导管上皮细胞膜E-Cad和 β -Cat的强阳性表达和个别胞质的弱阳性表达视为正常,其余均为异常表达。

统计学处理 PanIN-1A和PanIN-1B为低级别胰腺上皮内瘤变;PanIN-2和PanIN-3为高级别胰腺上皮内瘤变。统计软件为SPSS/PC,采用 χ^2 检验。

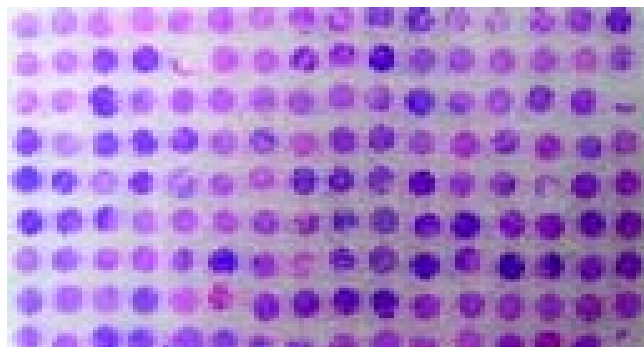


图1 胰腺病变组织芯片,含144个位点,HE × 4.

2 结果

2.1 E-Cad和 β -Cat在PanINs的表达 E-Cad和 β -Cat在正常胰腺腺泡、导管上皮和部分胰岛细胞膜上显示均质的强阳性染色,呈棕黄色颗粒状,个别细胞呈胞质弱阳性,胰腺间质细胞不着色。PanINs和胰腺癌中E-Cad膜表达明显降低或缺失,而胞质表达则明显升高,未见有胞核染色者。高级别PanINs和胰腺癌中,可见有 β -Cat膜表达的降低或缺失,而出现核和/或胞质的表达(图2)。

2.2 E-Cad和 β -Cat表达与胰腺癌临床病理学的关系 E-Cad和 β -Cat异常表达与胰腺癌患者年龄、性别及肿瘤大小无关($P>0.05$)。胰腺癌中E-Cad异常表达率明显高于正常胰腺导管和PanINs($P<0.05$),且与胰腺癌分化程度、淋巴结转移和神经浸润密切相关($P<0.05$)。而 β -连环素异常表达则与胰腺癌淋巴结转移和神经浸润明显相关($P<0.05$,表1)。我们还比较了导管腺癌、PanINs和正常导管上皮中E-Cad胞质的表达,发现正常胰腺导管上皮仅有个别呈胞质弱阳性,而在胰腺导管腺癌和PanINs中分别达到21.8%和34.7%,明显高于正常导管(1.5%)。高级别PanINs和胰腺癌中 β -Cat胞核和/或胞质表达率(27.3%, 29.8%)显著高于低级别

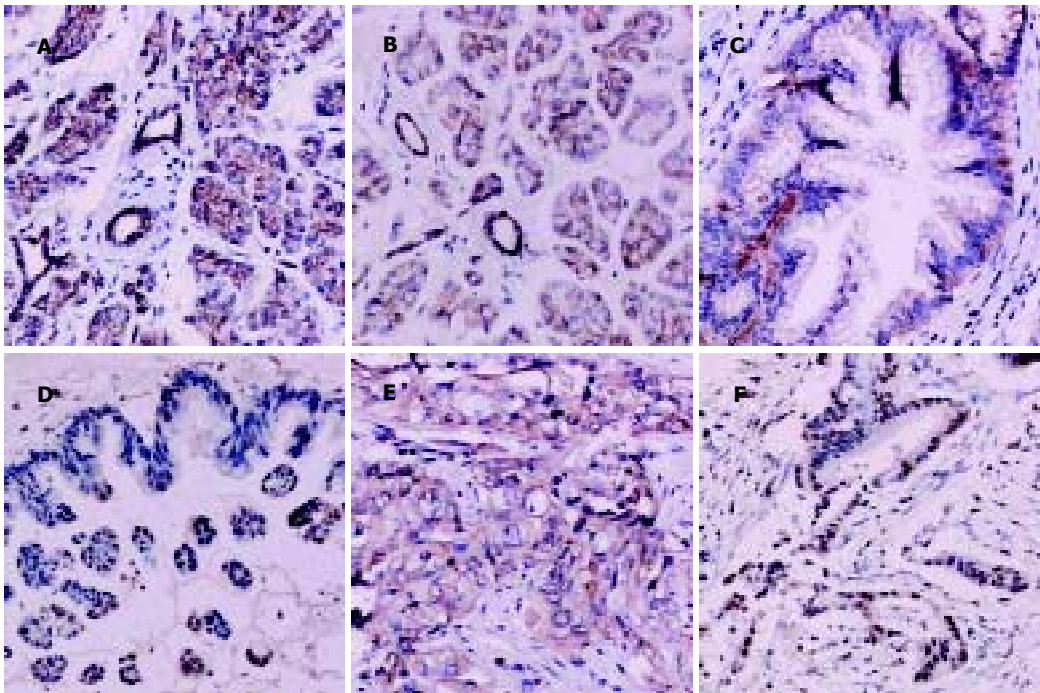


图2 胰腺病变中E-Cad和β-Cat的表达(EnVision法×200). A: 正常胰腺腺泡和导管上皮E-Cad呈膜强阳性; B: 正常胰腺腺泡和导管上皮β-Cat膜强阳性; C: PanIN中E-Cad膜表达降低而胞质表达增强; D: 高级别PanIN中β-Cat膜表达缺失而部分细胞核表达阳性; E: 胰腺癌中E-Cad膜表达降低, 而胞质表达增强; F: 胰腺癌中β-Cat膜表达缺失, 而部分细胞核表达阳性.

PanINs 和正常导管(3.0%, 2.3%).

表1 E-Cad和β-Cat异常表达与PanINs分级和胰腺癌临床病理学的关系

临床病理学参数	n	E-Cad		β-Cat	
		异常	正常	异常	正常
PanIN-1A	129	38	91	55	74
PanIN-1B	104	36	68	46	58
PanIN-2	22	8	14	14	8
PanIN-3	11	4	7	7	4
高分化癌	21	8	13	13	8
中分化癌	68	43	25 ^a	47	21
低分化癌	32	27	5	24	8
男	72	47	25	50	22
女	49	31	18	34	15
年龄 ≤ 40	4	2	2	2	2
40-60	48	30	18	33	15
> 60	69	46	23	49	20
肿瘤 < 3 cm	32	19	13	21	11
3-6 cm	62	40	22	43	19
> 6 cm	27	19	8	20	7
淋巴结转移 +	23	20	3 ^a	21	2 ^a
-	98	58	40	63	35
神经浸润 +	55	41	14 ^a	44	11 ^a
-	66	37	29	40	26

^aP<0.05 组内比较.

2.3 E-Cad和β-Cat在PanIN和胰腺癌中表达的相关性

266灶PanIN病变中同时E-Cad和β-Cat异常表达者72灶, 正常表达者126灶, 不一致者68灶. 二者呈非常显著的正相关性($P<0.01$). 胰腺癌中, E-Cad和β-Cat均有异常表达者46例, 正常表达者28例, 不一致者47例, 经统计学分析二者亦呈显著的正相关性($P<0.05$).

3 讨论

黏附素与连环素在上皮细胞间黏附和信号传导中起着十分重要的作用. E-Cad为钙依赖黏附蛋白家族成员之一, 相邻细胞E-Cad胞外区彼此结合形成拉链样结构介导同型细胞相互黏附, 胞质区则与β-Cat和α-Cat结合, 后者再与细胞骨架连接, 一起形成连接复合体, E-Cad功能的发挥离不开连环素的作用^[15-17]. β-连环素的另一个重要作用是作为Wnt信号通路的关键分子, 介导信号从胞膜至胞质再到胞核的传递. 在正常细胞中, β-Cat的表达主要在细胞膜, 胞质中很少, 而一旦在胞质中发生累积, β-Cat转位入核增多, 与转录因子TCF(T cell transcription factor)形成复合物, 促进下游靶基因, 如Cyclin D1, *c-myc*等表达增多, 从而引起细胞增生^[18].

研究显示, 在人类多种肿瘤中均存在E-Cad和β-Cat的异常^[19-22]. 胰腺癌组织E-Cad和β-Cat的表达研究亦见有报道^[23-24]. Joo *et al*^[25]用免疫组化法检测了30例胰腺癌组织中E-Cad和β-Cat的表达, 结果显示, 正常胰腺上皮细胞E-Cad和β-Cat呈一致性较强的膜表达, 而胰腺癌组织中60.0%病例E-Cad和56.7%病例β-Cat的膜表达减弱或缺失, 且与胰腺癌的分化差有关. 另外, E-Cad膜表达减弱或缺失与胰腺癌的临床分

期和淋巴结转移相关。Qiao *et al*^[26]对43例胰腺癌组织进行 β -Cat免疫组化研究,发现膜表达减少者为58.1%,有65.1%的病例出现胞质染色,二者都与Cyclin D1高表达明显相关。我们应用高通量组织芯片技术,分析了胰腺癌及其癌前病变-胰腺上皮内瘤变中E-Cad和 β -Cat的表达,结果显示在64.5%和69.4%的胰腺癌组织中存在E-Cad和 β -Cat的异常表达,且E-Cad异常表达与胰腺癌组织学分级、淋巴结转移和神经浸润密切相关, β -Cat异常表达与胰腺癌淋巴结转移和神经浸润密切相关。胰腺癌组织中E-Cad和 β -Cat的异常改变,一方面导致细胞间黏附功能下降,另一方面 β -Cat在胞质内异常集聚,并进入核中进而激活靶基因的表达,促进细胞增生。上述结果提示E-Cad和 β -Cat的异常与胰腺癌的生物学行为和预后有关。此外,我们还发现在胰腺上皮内瘤变中,E-Cad和 β -Cat胞膜表达均减弱或缺失,而胞质表达较正常胰腺导管为强;在高级别胰腺上皮内瘤变和胰腺癌中 β -Cat胞核和/或胞质的表达率明显高于低级别胰腺上皮内瘤变和正常导管。提示E-Cad和 β -Cat的异常改变在胰腺癌的发生阶段就已出现了,说明他们也参与了胰腺癌的形成。分析 β -Cat在胞质内积聚的机制可能包括APC基因突变或缺失, β -连环素基因突变和Wnt信号途径的活化。但在胰腺癌中有人未检测出 β -Cat基因的突变,推测可能系 β -Cat基因转录增加所致^[27-28]。

目前,对胰腺上皮内瘤变中基因变化的规律已有了一部分认识,了解到胰腺导管癌中的某些基因改变在PanIN中也存在,如K-ras等癌基因的活化,P16,P53和DPC4等抑癌基因的失活等^[29-31]。Hruban *et al*通过检测胰腺正常导管、各级胰腺上皮内瘤变和胰腺癌的基因改变,将胰腺癌的组织学进展与分子遗传学改变联系了起来,并建立了胰腺癌发生、发展的分子模型^[32],该模型初步揭示了胰腺癌发生过程中部分基因的变化规律。我们的研究显示在胰腺上皮内瘤变中亦存在着E-Cad和 β -Cat的异常改变,这是对胰腺上皮内瘤变中基因变化规律的补充,由于胰腺上皮内瘤变中分子改变极其复杂,要全面认识他尚有大量工作要做。

4 参考文献

- Julkunen K, Makinen K, Karja V, Kosma VM, Eskelinen M. alpha-, beta- and chi-catenin expression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2003;23:5043-5047
- Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, Ferreira VM, Lopes CS. Association of E-cadherin and beta-catenin immunoexpression with clinico- pathologic features in primary ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 2004;35:663-669
- Salahshor S, Hou H, Diep CB, Loukola A, Zhang H, Liu T, Chen J, Iselius L, Rubio C, Lothe RA, Aaltonen L, Sun XF, Lindmark G, Lindblom A. A germline E-cadherin mutation in a family with gastric and colon cancer. *Int J Mol Med* 2001;8: 439-443
- Deeb G, Wang J, Ramnath N, Slocum HK, Wiseman S, Beck A, Tan D. Altered E-cadherin and epidermal growth factor receptor expressions are associated with patient survival in lung cancer: a study utilizing high-density tissue microarray and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2004;17:430-439
- Sun W, Herrera GA. E-cadherin expression in invasive urothelial carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2004;8:17-22
- Karim R, Tse G, Putti T, Scolyer R, Lee S. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology* 2004;36:120-128
- Ebert MP, Yu J, Hoffmann J, Rocco A, Rocken C, Kahmann S, Muller O, Korc M, Sung JJ, Malfertheiner P. Loss of beta-catenin expression in metastatic gastric cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1708-1714
- Yamada Y, Oyama T, Hirose Y, Hara A, Sugie S, Yoshida K, Yoshimi N, Mori H. beta-Catenin mutation is selected during malignant transformation in colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2003;24:91-97
- Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Asimakopoulos B, Polychronidis A, Anagnostoulis S, Simopoulos C. Expression patterns of alpha-, beta- and gamma-catenin in pancreatic cancer: correlation with E-cadherin expression, pathological features and prognosis. *Anticancer Res* 2001;21:4127-4134
- Li YJ, Ji XR. Relationship between expression of E-cadherin-catenin complex and clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:368-372
- Miao J, Kusafuka T, Kuroda S, Yoneda A, Zhou Z, Okada A. Mutation of beta-catenin and its protein accumulation in solid and cystic tumor of the pancreas associated with metastasis. *Int J Mol Med* 2003;11:461-464
- Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N. Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas* 2004;28:257-262
- Kloppel G, Luttges J. The pathology of ductal-type pancreatic carcinomas and pancreatic intraepithelial neoplasia: insights for clinicians. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:111-118
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-847
- Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303:1483-1487
- Kikuchi A. Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:243-248
- Lu Z, Hunter T. Wnt-independent beta-catenin transactivation in tumor development. *Cell Cycle* 2004;3:571-573
- Song SY, Kim S, Kim DS, Son HJ, Rhee JC, Kim YI. Abnormal expression of E-cadherin in early gastric carcinoma: its relationship with macroscopic growth patterns and catenin alpha and beta. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:252-259
- Lin YC, Wu MY, Li DR, Wu XY, Zheng RM. Prognostic and clinicopathological features of E-cadherin, α -catenin, β -catenin, γ -catenin and cyclin D₁ expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10:3235-3239
- Choi YL, Xuan YH, Shin YK, Chae SW, Kook MC, Sung RH, Youn SJ, Choi JW, Kim SH. An immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in gallbladder lesions. *J Histochem Cytochem* 2004;52:591-601
- Alami J, Williams BR, Yeger H. Differential expression of E-cadherin and beta catenin in primary and metastatic Wilms's tumours. *Mol Pathol* 2003;56:218-225
- Yonemasu H, Takashima M, Nishiyama KI, Ueki T, Yao T, Tanaka M, Tsuneyoshi M. Phenotypical characteristics of undifferentiated carcinoma of the pancreas: a comparison with pancreatic ductal adenocarcinoma and relevance of E-cadherin, alpha catenin and beta catenin expression. *Oncol Rep* 2001;8:745-752
- Lowy AM, Fenoglio-Preiser C, Kim OJ, Kordich J, Gomez A, Knight J, James L, Groden J. Dysregulation of beta-catenin expression correlates with tumor differentiation in pancreatic duct adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2003;10:284-290
- Yonemasu H, Takashima M, Nishiyama KI, Ueki T, Yao T, Tanaka M, Tsuneyoshi M. Phenotypical characteristics of undifferentiated carcinoma of the pancreas: a comparison with

- pancreatic ductal adenocarcinoma and relevance of E-cadherin, alpha catenin and beta catenin expression. *Oncol Rep* 2001;8:745-752
- 25 Joo YE, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Expression of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatol* 2002;2:129-137
- 26 Qiao Q, Ramadani M, Gansauge S, Gansauge F, Leder G, Beger HG. Reduced membranous and ectopic cytoplasmic expression of beta -catenin correlate with cyclin D1 overexpression and poor prognosis in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2001;95:194-197
- 27 Gerdes B, Ramaswamy A, Simon B, Pietsch T, Bastian D, Kersting M, Moll R, Bartsch D. Analysis of beta-catenin gene mutations in pancreatic tumors. *Digestion* 1999;60:544-548
- 28 Abraham SC, Klimstra DS, Wilentz RE, Yeo CJ, Conlon K, Brennan M, Cameron JL, Wu TT, Hruban RH. Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor beta-catenin mutations. *Am J Pathol* 2002;160:1361-1369
- 29 Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* 2000;156:1821-1825
- 30 Gerdes B, Ramaswamy A, Ziegler A, Lang SA, Kersting M, Baumann R, Wild A, Moll R, Rothmund M, Bartsch DK. p16INK4a is a prognostic marker in resected ductal pancreatic cancer: an analysis of p16INK4a, p53, MDM2, an Rb. *Ann Surg* 2002;235:51-59
- 31 周国雄, 李兆申, 许国铭, 屠振兴. 胰腺癌 DPC4/Smad4 基因突变及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:328-332
- 32 Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2969-2972

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

WJG 和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传, 于 2003-04-15 开通. WJG 包括: 1995-2004 年 1-12 期及特刊. 世界华人消化杂志包括: 1993-2004 年第 1-5 期及特刊.

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者). 高影响力论文排序: 点击次数, 下载次数, 引用次数. 高影响力论文即特别受同行关注, 影响范围广, 被点击次数、下载次数、引用次数多的论文. 一篇论文如果能进入高影响力论文行列, 其研究成果一般多有创新性, 学术水平较高, 学术价值较大, 因而影响力大. 投稿须知包括: 投稿细则, 述评, 研究原著, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告等要求及书写格式.

2 网址

WJG (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)

世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)

3 论文摘要格式

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护.

世界华人消化杂志 2004年 5月;12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠.

100101, 北京市, 中国人民解放军第306医院载人航天主着陆场医疗救护队. yuemx@ns.cetin.net.cn

目的: 探讨中国首次载人航天主着陆场区航天员医疗保障及救护的经验体会. 方法: 结合我们参加中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的体会, 8次在直升机上的医疗救护演练经验, 2次突发意外事故乘直升机远距离实施医疗救护的体会, 多次在载人航天医疗救护车上的医疗救护演练体会. 并参考国内外相关资料, 对载人航天航天员意外伤害提出有效的防治预案. 结果: 主要针对首飞载人航天航天员可能发生意外伤害的原因, 创新地把一个高质量的 ICU 全天候前移至草原上、沙漠里, 载体是载人航天医疗救护直升机及医疗救护车, 可以确保意外情况下航天员的安全. 创造了反应速度第一; 技术装备第一. 使救治规则、卫勤保障原则更趋于合理, 抢救成功率更高. 载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求. 航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应, 立体救护”的理念. 载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用, 他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可着落实施救护. 结论: 返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护, 能保障航天员安全, 圆满完成载人航天任务.

论文目次

目次网页包括: 岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004年 5月;12(5):1009-1014. 功能目次包括: 点击率: 71, 下载率: 9, 引用率: 0, 摘要, 相关文章, 被引用次数, HTML, PDF.

4 全文

全文网页包括: 投稿, 摘要, PDF, 被引用, 点击率: 72, 下载率: 9, 相关文章, 相关评论, 图片及参考文献外链接.

5 投稿查询

投稿查询网页包括: 编号, 刊名, 题目, 作者, E-mail, 收稿, 送审, 审回, 退稿, 接受, 审稿费, 出版费, 彩色图制作费, 黑白图制作费, 英文摘要加工费, 英文全文加工费, 加急费, 其他, 发票编号, 送修, 修回, 重修, 编辑, 入库, 卷号, 期号, 起止页. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

依那普利对CCl₄急性肝损伤大鼠抗氧化功能的影响

张剑平, 魏红山, 刘顺爱, 郭晶晶, 张黔英, 石小红, 张四平, 刘志英, 冯鑫, 吕洪波

张剑平, 魏红山, 刘顺爱, 郭晶晶, 张四平, 刘志英, 冯鑫, 北京地坛医院研究室 北京市 100011

张黔英, 石小红, 吕洪波, 北京地坛医院病理科 北京市 100011
张剑平, 女, 1959-10-28 生, 汉族, 副研究员, 医学学士, 主要从事抗感染免疫学和中医药免疫学工作。

项目负责人: 张剑平, 100011, 北京市地坛医院研究室。

电话: 010-64211031-2358

收稿日期: 2004-07-09 接受日期: 2004-09-04

Effect of Enalapril on acute liver injury induced by CCl₄ in rats and its anti-oxidative function

Jian-Ping Zhang, Hong-Shan Wei, Shun-Ai Liu, Jing-Jing Guo, Qian-Ying Zhang, Xiao-Hong Shi, Si-Ping Zhang, Zhi-Ying Liu, Xin Feng, Hong-Buo Lv

Jian-Ping Zhang, Hong-Shan Wei, Shun-Ai Liu, Jing-Jing Guo, Si-Ping Zhang, Zhi-Ying Liu, Xin Feng, Virological Laboratory, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Qian-Ying Zhang, Xiao-Hong Shi, Hong-Buo Lv, Department of Pathology, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011

Correspondence to: Jian-Ping Zhang, Virological Laboratory, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China.

Received: 2004-07-09 Accepted: 2004-09-04

Abstract

AIM: To investigate the effect of Enalapril on acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats and its anti-oxidative function.

METHODS: Fifty normal male SD rats were randomly divided into five groups (10 rats/group): Enalapril interventional groups A, B, and C (10, 5, and 2.5 mg/kg, respectively), injury-model group, and control group. Rats in interventional and model groups were given hypodermic CCl₄ (diluted with an equal volume of olive oil). Rats in control group received normal saline injection. Rats with liver injury induced by CCl₄ were then treated with Enalapril (10, 5, 2.5; ig). The activities of serum aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and total bile acid (TBA) were detected using full automatic biochemical analyzer. Superoxide dismutase (SOD), xanthine oxidase (XOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), and malondialdehyde (MDA) were determined using colorimetric method.

RESULTS: Enalapril significantly reduced serum ALT (685 ± 63 , $1\,241 \pm 168$, $1\,705 \pm 83$, $2\,302 \pm 174$ nkat/L vs $3\,531 \pm 776$ nkat/L in control, A, B, C versus model group respectively; $P < 0.01$), AST ($1\,240 \pm 158$, $2\,430 \pm 386$ nkat/L vs $3\,372 \pm 138$ nkat/L in control, A versus model group; $P < 0.01$, $P < 0.05$ respectively), ALP ($2\,659 \pm 248$, $2\,567 \pm 159$ nkat/L vs $3\,609 \pm 346$ nkat/L in control, A versus model group; $P < 0.01$) and TBA (8.48 ± 0.49 , 16.35 ± 5.43 , $16.92 \pm$

2.68 $\mu\text{mol/L}$ vs 24.16 ± 9.27 $\mu\text{mol/L}$ in control, A, B versus model group; $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$ respectively) in acute liver injury induced by CCl₄. The level of XOD in model group was significantly higher than that in control, A, B and C groups ($1\,042 \pm 188$ nkat/L vs 571 ± 28 , 724 ± 18 , 821 ± 28 , 868 ± 58 nkat/L; $P < 0.01$). SOD level in model group was significantly higher than that in control and A group ($8\,579 \pm 861$ nkat/L vs $6\,006 \pm 639$, $7\,135 \pm 1\,560$ nkat/L; $P < 0.01$, $P < 0.05$). MDA level in interventional group was obviously lower than that in model group and GSH-PX level was obviously higher than that in model group.

CONCLUSION: Enalapril has protective effects for rats with acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride and the mechanism closely relates to its anti-oxidative function.

Zhang JP, Wei HS, Liu SA, Guo JJ, Zhang QY, Shi XH, Zhang SP, Liu ZY, Feng X, Lv HB. Effect of Enalapril on acute liver injury induced by CCl₄ in rats and its anti-oxidative function. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2638-2641

摘要

目的: 研究依那普利对四氯化碳(CCl₄)所致急性肝损伤大鼠肝损伤和抗氧化功能的作用。

方法: 将 50 只 δ SD 大鼠随机分为 5 组(每组 10 只): 药物干预组(10 mg/kg, 5 mg/kg 和 2.5 mg/kg)、模型组和正常对照组, 药物干预组和模型组均给予皮下注射 CCl₄(用等体积的橄榄油稀释), 以制备急性肝损伤的大鼠模型, 正常对照组用等体积的生理盐水注射, 用高(10 mg/kg)、中(5 mg/kg)、低(2.5 mg/kg)剂量依那普利分别对 SD 大鼠灌胃给药。全自动生化分析仪测定大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、胆汁酸(TBA)的活性; 用比色分析法测定超氧化物歧化酶(T-SOD)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性及丙二醛(MDA)的含量。

结果: 依那普利显著降低因 CCl₄ 所致急性肝损伤大鼠血清 ALT(正常对照组 685 ± 63 nkat/L < 10 mg 干预组 $1\,241 \pm 168$ nkat/L < 5 mg 干预组 $1\,705 \pm 83$ nkat/L < 2.5 mg 干预组 $2\,302 \pm 174$ nkat/L < 模型对照组 $3\,531 \pm 776$ nkat/L), AST(正常对照组 $1\,240 \pm 158$ nkat/L < 10 mg 干预组 $2\,430 \pm 386$ nkat/L < 5 mg 干预组 $2\,788 \pm 522$ nkat/L < 2.5 mg 干预组 $3\,151 \pm 917$ nkat/L < 模型对照组 $3\,372 \pm 138$ nkat/L), ALP(10 mg 干预组 $2\,567 \pm 159$ nkat/L < 正常对照组 $2\,659 \pm 248$ nkat/L < 5 mg 干预组 $3\,212 \pm 198$ nkat/L < 2.5 mg 干预组 $3\,231 \pm 261$ nkat/L < 模型对照组 $3\,609 \pm 346$ nkat/L) 和 TBA(正常对照组 8.48 ± 0.49 $\mu\text{mol/L}$ < 10 mg 干预组 16.35 ± 5.43 $\mu\text{mol/L}$ < 5 mg 干预组 16.92 ± 2.68 $\mu\text{mol/L}$ < 2.5 mg 干

预组 $17.53 \pm 3.59 \mu\text{mol/L}$ < 模型对照组 $24.16 \pm 9.27 \mu\text{mol/L}$ 的升高. 对急性肝损伤大鼠血清 GSH-PX (模型对照组 $50 \pm 54 \text{ nkat/L}$ < 2.5 mg 干预组 $149 \pm 111 \text{ nkat/L}$ < 10 mg 干预组 $169 \pm 141 \text{ nkat/L}$ < 5 mg 干预组 $170 \pm 91 \text{ nkat/L}$ < 正常对照组 $295 \pm 194 \text{ nkat/L}$) 的活性有明显的升高作用及降低 T-SOD (正常对照组 $6\,006 \pm 639 \mu\text{kat/L}$ < 10 mg 干预组 $7\,135 \pm 1\,560 \mu\text{kat/L}$ < 2.5 mg 干预组 $7\,538 \pm 938 \mu\text{kat/L}$ < 5 mg 干预组 $7\,589 \pm 780 \mu\text{kat/L}$ < 模型对照组 $8\,579 \pm 861 \mu\text{kat/L}$) 和 XOD (正常对照组 $571 \pm 28 \text{ nkat/L}$ < 10 mg 干预组 $724 \pm 18 \text{ nkat/L}$ < 5 mg 干预组 $821 \pm 28 \text{ nkat/L}$ < 2.5 mg 干预组 $868 \pm 58 \text{ nkat/L}$ < 模型对照组 $1\,042 \pm 188 \text{ nkat/L}$) 的含量. 以上均与模型对照组比较 ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

结论: 依那普利的保肝机制和抗氧化作用与其对抗自由基脂质过氧化密切相关.

张剑平, 魏红山, 刘顺爱, 郭晶晶, 张彩英, 石小红, 张四平, 刘志英, 冯鑫, 吕洪波. 依那普利对 CCl₄ 急性肝损伤大鼠抗氧化功能的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12(11): 2638-2641

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2638.asp>

0 引言

依那普利具有良好的细胞保护作用, 他通过抑制肝脏受体血管紧张素转化酶减少肝移植后局部缺血/再灌注的损害^[1]. 也可拮抗抗肿瘤药物造成的小鼠心脏和肝脏的毒性作用^[2], 在肾炎^[3-4]和肾脏移植后^[5-7]对肾脏细胞以及心肌细胞^[8-11]都具有一定的保护作用. 我们通过 CCl₄ 损伤大鼠模型, 明确依那普利对急性肝损伤的抗氧化功能的影响, 试图阐明其抗肝损伤的可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD 大鼠 50 只, 体质量 250-300 g (购自中国药物生物制品鉴定所动物中心), 随机分为 5 组, 每组 10 只; 分别为正常组, 模型损伤组, 低剂量药物干预组, 中剂量药物干预组和高剂量药物干预组. 除正常对照组外, 各组 SC 500 mL/L CCl₄ 橄榄油溶液^[12] (CCl₄: 橄榄油 1:1, 3 mL/kg, 首次倍量 6 mL/kg).

1.2 方法 将低、中、高 3 个剂量组连续灌胃 (依那普利 2.5, 5, 10 mg/kg). 第 5 d 灌胃后 1 h, 模型损伤组和 3 个依那普利干预组同时 SC 500 mL/L CCl₄ 橄榄油溶液, 正

常组皮下注射相同体积的生理盐水, 每隔 2 d SC 1 次, 共 3 次. 第 12 d 将 5 组 SD 大鼠以颈动脉结扎采血, 肝素锂抗凝全血 2 mL, 全自动生化分析仪测定大鼠血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、胆汁酸 (TBA) 的活性, 由本院检验科生化室完成; 用比色分析法测定超氧化歧化酶 (T-SOD)、黄嘌呤氧化酶 (XOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性及丙二醛 (MDA) 的含量, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 按操作说明书进行. 肝脏组织以 40 g/L 甲醛液固定, 作常规组织石蜡切片, 进行病理组织检查. HE 染色, 光镜下观察肝脏损伤情况, 肝小叶是否结构完整, 肝细胞有无明显病变.

统计学处理 将所得数据用 SPSS 10.0 软件包作 *t* 检验, 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 计量资料采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 组织病理学检查 光镜下对照组肝小叶结构完整, 肝细胞无明显异常病变. 模型组 SD 大鼠肝组织损伤明显, 肝细胞出现细胞核固缩, 明显气球样变 (重度脂变), 多发融合性坏死, 炎性细胞浸润, 并以小血管周围带为主, 还出现了轻度的纤维增生. 依那普利治疗组, 肝细胞损伤较模型组明显减轻, 肝小叶结构清楚, 仅有少量轻度脂肪变性 (图 1, 表 1).

表 1 各组大鼠肝组织病理学检查结果

分组	细胞变性	坏死程度	纤维化
正常对照组	-	-	-
干预组 (10 mg)	轻度脂变 (30%)	(V) 周围少许点灶状坏死	-
干预组 (5 mg)	中度脂变 (50%)	灶状融合性坏死	-
干预组 (2.5 mg)	中重度脂变 (70%)	融合性坏死	少许纤维增生
模型对照组	重度脂变 (90%)	多发融合性坏死	轻度纤维增生

2.2 肝功能变化 依那普利明显降低 CCl₄ 所致急性肝损伤大鼠血清 ALT, AST 的升高, 模型组 ALT, AST, ALP 和 TBA-C 水平较正常组高. (表 2).

2.3 氧化应激状态变化 模型组大鼠血清中 T-SOD 的活性、XOD 含量明显增高, GSH-PX 活性升高, 但差异不显著, 而 MDA 的则无明显变化. 药物干预组在急性肝损伤后血清中 T-SOD 的活性明显比模型损伤组

表 2 各组大鼠血清 ALT, AST, ALP 和 TBA-C 水平比较 (mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	ALP (nkat/L)	TBA ($\mu\text{mol/L}$)
正常对照组	10	685 ± 63^b	$1\,240 \pm 158^b$	$2\,659 \pm 248^b$	8.48 ± 0.49^b
干预组 (10 mg)	9	$1\,241 \pm 168^b$	$2\,430 \pm 386^a$	$2\,567 \pm 159^b$	16.35 ± 5.43^a
干预组 (5 mg)	9	$1\,705 \pm 83^b$	$2\,788 \pm 522$	$3\,212 \pm 198$	16.92 ± 2.68^a
干预组 (2.5 mg)	9	$2\,302 \pm 174^b$	$3\,151 \pm 917$	$3\,231 \pm 261$	17.53 ± 3.59
模型对照组	9	$3\,531 \pm 776$	$3\,372 \pm 138$	$3\,609 \pm 346$	24.16 ± 9.27

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs model group.

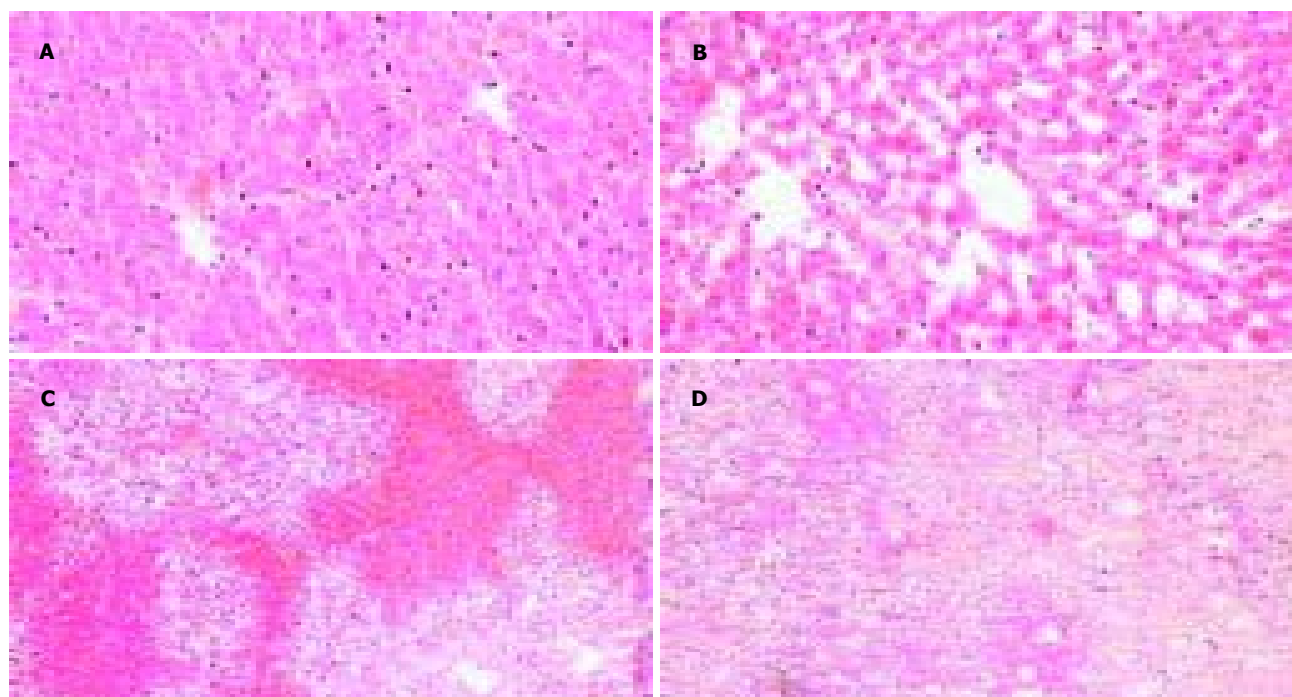


图1 病理学检查结果. A: 正常对照组; B: 干预组(10 mg) – 轻度脂变(30%); C: 干预组(5 mg) – 中度脂变(50%); D: 干预组(2.5 mg) – 重度脂变(95%).

低,二者之间有明显差别;从XOD的变化可以看出,依那普利治疗后,小鼠肝脏的XOD含量明显低于模型损伤组,而与高低剂量组之间也有明显区别(表3).

表3 各组大鼠血清XOD, T-SOD, MDA和GSH-PX水平比较(mean \pm SD)

组别	n	XOD(nkat/L)	T-SOD(μ kat/L)	MDA(μ mol/L)	GSH-PX(nkat/L)
正常对照组	10	571 \pm 28 ^b	6 006 \pm 639 ^b	6.49 \pm 2.01	295 \pm 194 ^b
干预组(10mg)	9	724 \pm 18 ^b	7 135 \pm 1 560 ^a	5.56 \pm 1.96	169 \pm 141
干预组(5mg)	9	821 \pm 28 ^b	7 589 \pm 780	5.78 \pm 1.42	170 \pm 91
干预组(2.5mg)	9	868 \pm 58 ^b	7 538 \pm 938	4.66 \pm 0.64	149 \pm 111
模型对照组	9	1 042 \pm 188	8 579 \pm 861	7.19 \pm 2.18	50 \pm 54

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs model group.

3 讨论

文献报道, CCl₄是一种有毒的环境生物损害剂,在肝氧化代谢中可产生三氯甲基自由基,继而攻击脂质细胞膜,造成肝细胞脂质过氧化性损伤^[12-13].自由基和脂质过氧化可破坏细胞内钙稳态,引起细胞代谢紊乱甚至死亡,并使黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶,加速氧自由基的产生,从而加剧肝损伤^[12, 14-15].研究表明,肝损伤是多因素参与的复杂过程^[16-19],大量肝细胞受损导致血清ALT, AST显著升高^[20-23].本实验证实CCl₄可使小鼠血浆转氨酶活力明显上升,同时肝匀浆脂质过氧化产物MDA含量明显增加^[24-28].说明CCl₄引起肝损伤的机制与脂质过氧化有关.依那普利能显著降低因CCl₄所致急性肝损伤大鼠血清ALT, AST, ALP和TBA活性升高,表明其具有良好的降酶作用及明显减轻肝细胞损伤程度.我们在模型组大鼠肝脏组织病理切片中观察

到,肝小叶索状排列紊乱,肝细胞重度脂变(90% \pm),出现细胞核固缩,并有多发融合性坏死,炎性细胞浸润和轻度的纤维增生.药物干预组则肝细胞损伤明显减轻,明显降低CCl₄对肝组织的损伤.说明可减轻肝实质损伤,抑制肝内胶原纤维增生,因而延缓肝纤维化的形成.本实验中肝损伤模型组, GSH-PX活性升高,但差异不显著,可能依那普利不直接清除自由基,而是通过调节参与体内抗氧化酶的表达来实现的.研究结果中药物干预组大鼠血清SOD的活性明显升高,而XOD的含量则降低. SOD为高效的清道夫,可抑制自由基启动的脂质过氧化, XOD活性变化表明,由于XOD在黄嘌呤代谢中可以产生氧自由基,依那普利可以降低其活性,减少氧自由基的产生,从而降低细胞的损伤,这也证明依那普利可能是通过调节体内酶的表达来减少氧化损伤的,其本身的氧化还原状态直接影响其活性与功能.结合以往的研究,推测依那普利在体内能起到抗氧化损伤作用,其保肝机制与其抗自由基脂质过氧化密切相关.这为今后的研究及应用打下坚实的基础.

总之,依那普利对CCl₄所致大鼠急性肝损伤具有良好的保护作用,其机制在于氧化应激的情况下,通过稳定胞质[Ca²⁺]浓度和调节细胞内抗氧化酶的水平,抑制自由基对细胞的损伤,以达到保护肝细胞和抗氧化作用.

4 参考文献

- 1 Anthuber M, Farkas S, Rihl M, Menger MD, Schiöberg FW, Jauch KW, Messmer K. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Enalapril: a novel approach to reduce ischemia/reperfusion damage after experimental liver transplantation. *Hepatology* 1997;25:648-651
- 2 Abd El-Aziz MA, Othman AI, Amer M, El-Missiry MA. Po-

- tential protective role of angiotensin-converting enzyme inhibitors captopril and enalapril against adriamycin-induced acute cardiac and hepatic toxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2001; 21:469-473
- 3 Akula A, Veeravalli KK, Kota MK, Routhu KV. Studies on the involvement of bradykinin using enalapril and 2-mercaptoethanol in ischemia-reperfusion induced myocardial infarction in albino rats. *Pharmazie* 2003;58:906-909
 - 4 Toblli JE, Ferder L, Stella I, Angerosa M, Inserra F. Enalapril prevents fatty liver in nephrotic rats. *J Nephrol* 2002;15:358-367
 - 5 Perez De Lema G, De Wit C, Cohen CD, Nieto E, Molina A, Banas B, Luckow B, Vicente AB, Mampaso F, Schlondorff D. Angiotensin inhibition reduces glomerular damage and renal chemokine expression in MRL/lpr mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:275-281
 - 6 Pazoki-Toroudi HR, Hesami A, Vahidi S, Sahebjam F, Seifi B, Djahanguiri B. The preventive effect of captopril or enalapril on reperfusion injury of the kidney of rats is independent of angiotensin II AT1 receptors. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17:595-598
 - 7 de Cavanagh EM, Inserra F, Toblli J, Stella I, Fraga CG, Ferder L. Enalapril attenuates oxidative stress in diabetic rats. *Hypertension* 2001;38:1130-1136
 - 8 White CT, Macpherson CF, Hurley RM, Matsell DG. Antiproteinuric effects of enalapril and losartan: a pilot study. *Pediatr Nephrol* 2003;18:1038-1043
 - 9 de Cavanagh EM, Inserra F, Ferder L, Fraga CG. Enalapril and captopril enhance glutathione-dependent antioxidant defenses in mouse tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278:R572-577
 - 10 Scribner AW, Loscalzo J, Napoli C. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function and oxidant stress. *Eur J Pharmacol* 2003;482:95-99
 - 11 Donmez G, Derici U, Erbas D, Arinsoy T, Onk A, Sindel S, Hasanoglu E. The effects of losartan and enalapril therapies on the levels of nitric oxide, malondialdehyde, and glutathione in patients with essential hypertension. *Jpn J Physiol* 2002;52: 435-440
 - 12 Ishihara A, Ohira Y, Tanaka M, Nishikawa W, Ishioka N, Higashibata A, Izumi R, Shimazu T, Ibata Y. Cell body size and succinate dehydrogenase activity of spinal motoneurons innervating the soleus muscle in mice, rats, and cats. *Neurochem Res* 2001;26:1301-1304
 - 13 Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 1989;43:139-154
 - 14 Lemire BD, Oyedotun KS. The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 2002;1553:102-116
 - 15 Wu Y, Liu C, Chen Q. Effect of acupuncture on enzymology of motor neuron of anterior horn of experimental spinal cord injury in rats. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1999;19:740-742
 - 16 Faouzi S, Le Bail B, Neaud V, Boussarie L, Saric J, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Rosenbaum J. Myofibroblasts are responsible for collagen synthesis in the stroma of human hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study. *J Hepatol* 1999;30:275-284
 - 17 Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT 1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl₄. *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
 - 18 Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Cheng JL, Xu QF. The regulatory role of AT 1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl₄. *World J Gastroenterol* 2000;6: 824-828
 - 19 田耕, 于皆平, 罗和生, 余保平, 李建英. 环氧合酶-2在急性肝损害中的作用机制. *世界华人消化杂志* 2002;10:24-27
 - 20 Giffen PS, Pick CR, Price MA, Williams A, York MJ. Alpha-glutathione S-transferase in the assessment of hepatotoxicity its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat. *Toxicol Pathol* 2002;30:365-372
 - 21 Sotelo-Felix JJ, Martinez-Fong D, Muriel P, Santillan RL, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity. in the rat. *J Ethnopharmacol* 2002;81:145-154
 - 22 Hung DY, Chang P, Cheung K, McWhinney B, Masci PP, Weiss M, Roberts MS. Cationic drug pharmacokinetics in diseased livers determined by fibrosis index, hepatic protein content microsomal activity, and nature of drug. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:1079-1087
 - 23 Stedman C. Herbal hepatotoxicity. *Semin Liver Dis* 2002;22: 195-206
 - 24 Nakade Y, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Involvement of endogenous CRF in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Am J Physiol Regul Integr Physiol* 2002;282:R1782-1788
 - 25 Shimizu H, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K. Carbon tetrachloride-induced acute liver injury in Mini and Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol* 2001;53:11-17
 - 26 Bruckner JV, Ramanathan R, Lee KM, Muralidhara S. Mechanisms of circadian rhythmicity of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:273-281
 - 27 Zhao Y, Liu L, Fu Z, Lu Y. Protective effect of Huyin decoction on acute hepatic injury induced by CCl₄ in mice. *Zhong Yao Cai* 2001;24:886-887
 - 28 Campo GM, Squadrito F, Ceccarelli S, Calo M, Avenoso A, Campo S, Squadrito G, Altavilla D. Reduction of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by IRFI042, a novel dual vitamin E-like antioxidant. *Free Radic Res* 2001;34:379-393

胃肠道间质瘤 p21WAF1 和 Bax 表达的临床意义

戚基萍, 徐凤琳, 吴爱萍

戚基萍, 徐凤琳, 吴爱萍, 哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科
黑龙江省哈尔滨市 150001
戚基萍, 女, 1960-08-18 生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族. 2004 年哈尔滨医
科大学博士生, 教授, 主要从事消化系统的病理研究.
项目负责人: 戚基萍, 150001, 黑龙江省哈尔滨医科大学第一临床医学院病
理科. qijiping2003@163.com
电话: 0451-88775468
收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-09-04

Expression of p21WAF1 and Bax in gastrointestinal stromal tumors and its clinical significance

Ji-Ping Qi, Feng-Lin Xu, Ai-Ping Wu

Ji-Ping Qi, Feng-Lin Xu, Ai-Ping Wu, Department of Pathology, First
Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang
Province, China
Correspondence to: Ji-Ping Qi, Department of Pathology, First Hospi-
tal of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province,
China. qijiping2003@163.com
Received: 2004-07-20 Accepted: 2004-09-04

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the expres-
sion of p21WAF1 and Bax and clinicopathologic character-
istics in gastrointestinal stromal tumors (GIST), and to
analyze the role of p21WAF1 and Bax in GIST.

METHODS: Immunohistochemical SP method was used to
detect p21WAF1 and Bax expression in 40 cases of GIST.

RESULTS: p21WAF1 was expressed in the nucleus of 21
cases of GIST (52.5%), and Bax was expressed in the
cytoplasm of 22 patients (55.0%). The expression of
p21WAF1 and Bax had no significant relationship with sex,
age of patients, as well as localization, size, necrosis, histo-
logical typing of GIST, but it significantly related to histo-
logical grading ($\chi^2 = 20.217$, $P = 0.000 < 0.01$; $\chi^2 = 22.896$,
 $P = 0.000 < 0.01$; respectively). There were higher rates
of p21WAF1 and Bax expression in potential malignant and
malignant GIST than those in benign one (p21WAF1: 80.0 %,
80.0% vs 6.7%, $P < 0.01$; Bax: 90.0%, 80.0% vs 6.7%,
 $P < 0.01$). The difference of p21WAF1 and Bax expression
between potential malignancy and malignancy was not
significant. There was a positive correlation between
p21WAF1 and Bax expression ($r = 0.448$, $\chi^2 = 8.021$, $P =$
 $0.005 < 0.01$, $Kappa = 0.447$) in GIST.

CONCLUSION: The expression of p21WAF1 and Bax plays
an important role in the pathogenesis of potential malig-
nant and malignant GIST, but not in benign GIST, which
may be used as an index to differentiate benign GIST from
potential malignant and malignant ones.

Qi JP, Xu FL, Wu AP. Expression of p21WAF1 and Bax in gastrointes-
tinal stromal tumors and its clinical significance. Shijie Huaren Xiaohua
Zazhi 2004;12(11):2642-2645

摘要

目的: 探讨p21WAF1 和Bax的表达与胃肠道间质瘤的临床
病理学特征的关系, 分析p21WAF1 和Bax在GIST 中的作
用及其相关性.

方法: 应用免疫组化SP法观察40例胃肠道间质瘤中p21WAF1
和 Bax 的表达情况.

结果: 在 GIST 40 例中, 21 例表达 p21WAF1, 阳性表达
率为 52.5%, p21WAF1 阳性信号定位于细胞核; 22 例表
达 Bax, 阳性表达率 55.0%, Bax 阳性信号定位于细胞
质. p21WAF1 和 Bax 的表达与 GIST 的性别、年龄、部
位、肿瘤大小、有无坏死、组织学分型无关, 与组织学分
级有关($\chi^2 = 20.217$, $P = 0.000 < 0.01$; $\chi^2 = 22.896$, $P =$
 $0.000 < 0.01$). p21WAF1 和 Bax在潜在恶性和恶性GIST中表
达较高, 而在良性 GIST 表达较低 (80.0%, 80.0%, 6.7%
和 90.0%, 80.0%, 6.7%). 进一步通过两两比较, 良性和
潜在恶性之间, 良性和恶性之间表达率 p21WAF1 和 Bax 表
达率有显著差别($P < 0.01$), 但潜在恶性和恶性之间 p21WAF1
和 Bax 的表达率无显著性差异. p21WAF1 和 Bax 的表达具
有一定的正相关性 ($r = 0.448$, $\chi^2 = 8.021$, $P = 0.005$,
 $Kappa = 0.447$).

结论: p21WAF 和 Bax 在潜在恶性和恶性 GIST 中发挥作
用, 但在良性 GIST 中不发挥作用, 二者可作为区别 GIST
良恶性的指标.

戚基萍, 徐凤琳, 吴爱萍. 胃肠道间质瘤 p21WAF1 和 Bax 表达的临床意义.
世界华人消化杂志 2004;12(11):2642-2645
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2642.asp>

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是发生于
消化道最常见的间叶性肿瘤^[1]. 由于 *c-kit* 基因突变与 GIST
的发病机制有关^[2], 因此, 目前 *c-kit* (CD117)阳性被认为
是诊断 GIST 的最可靠的指标^[3]. 但由于 GIST 的生物学行
为难以预测^[4], 一些可以保持多年没有症状, 而另一些
已发生转移^[5]. 因此, 就需要一个能判断 GIST 生物学行
为的客观指标. 我们应用免疫组化 SP 法检测 40 例 GIST
中 p21WAF1 和 Bax 的表达与临床病理学特征的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科2001/2004 年病理诊断为 GIST 的标本 40 例. 参考 Haber *et al* 在《外科病理鉴别诊断》(人民卫生出版社, 2002)中提到的诊断标准, 恶性指标: 黏膜侵犯, 肿瘤坏死和显著的细胞多形性, 胃肿瘤大于 6 cm, 核分裂像大于 4/50HPF, 小肠肿瘤大于 5 cm, 核分裂像大于 5/50HPF. 良性指标: 肿瘤小于 5 cm 或核分裂小于 5/50HPF, 且细胞数量少, 器官样生长, 细胞多形性很少见, 无黏膜侵犯或坏死. 介于二者之间的为潜在恶性 GIST. 按此标准: 40 例 GIST 中良性 15 例, 潜在恶性 10 例, 恶性 15 例. 其中胃 15 例, 肠 13 例, 其他(食管、肠系膜)12 例. 男 20 例, 女 20 例. 年龄 36~78(平均 54.3 岁).

1.2 方法 全部标本均经 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 连续切片经过脱蜡、水化, 采用 SP 法进行免疫组化染色, p21WAF1 mAb (1 : 25)和 Bax mAb (1 : 50)均购自北京中山生物技术有限公司, 实验中以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 用已知 p21WAF1 和 Bax 阳性组织作阳性对照. p21WAF1 以细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性, 阳性细胞数 <10% 为(+), >50% 为(+++), 介于二者之间为(++); Bax 以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性, 阳性细胞数 <10% 为(+), >60% 为(+++), 介于二者之间为(++).

统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行统计分析, 根据不同要求分别进行了 Pearson χ^2 检验, Fisher 确切概率法, Spearman 等级相关分析和 Kappa 检验. 认为双尾 $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 p21WAF1 在 GIST 中的表达 在 GIST 40 例中, 21 例(52.5 %) p21WAF1 表达阳性, 阳性信号定位于细胞核. 通过 χ^2 检验, 不同性别、不同年龄、不同部位、组织学分型、肿瘤直径在小于或大于 5 cm, 及有无坏死之间 p21WAF1 的表达率无显著性差异, 但与 GIST 组织学分级有关($P < 0.01$). 与良性 GIST 的阳性表达率为 6.7% 相比(图 1A), 潜在恶性和恶性 GIST 的阳性表达率均为 80%(图 1B), 有显著提高. 进一步通过两两比较显示,

良性和潜在恶性或恶性 GIST 之间 p21WAF1 的阳性表达率差异显著(均为 $P < 0.01$). 但潜在恶性和恶性之间的表达率无显著差别(表 1).

表 1 GIST 中 p21WAF1 和 Bax 表达与临床病理学的关系

项目	n	p21WAF1 阳性		Bax 阳性	
		n	%	n	%
男	20	10	50.0	12	60.0
女	20	11	55.0	10	50.0
年龄 ≥ 50	21	13	61.9	12	57.1
< 50	19	8	42.1	10	52.6
部位 胃	15	8	53.3	7	46.7
肠	13	7	53.8	7	53.8
其他	12	6	50.0	8	66.7
组织学 梭形	15	8	53.3	7	46.7
上皮样	15	9	60.0	7	46.7
混合性	10	4	40.0	8	80.0
肿瘤直径 < 5 cm	16	9	56.3	10	62.5
≥ 5 cm	24	12	50.0	12	50.0
坏死 有	18	10	55.6	9	50.0
少 / 无	22	11	50.0	13	59.1
良性	15	1	6.7	1	6.7
潜在恶性	10	8	80.0 ^b	9	90.0 ^b
恶性	15	12	80.0	12	80.0

^b $P < 0.01$.

2.2 Bax 在 GIST 中的表达 在 GIST 40 例中, 22 例(55.0%) Bax 表达阳性, 阳性信号定位于细胞质. 通过 χ^2 检验, 不同性别、不同年龄、不同部位、组织学分型、肿瘤直径在小于或大于 5 cm 之间, 及有无坏死之间 Bax 的表达率无显著性差异. 但与 GIST 的组织学分级有关($P < 0.01$). 与良性 GIST 的阳性表达率为 6.7% 相比, 潜在恶性和恶性 GIST 的阳性表达率为 90% 和 80% (图 2A、B), 有显著提高. 进一步通过两两比较显示, 良性和潜在恶性或恶性 GIST 之间 Bax 的阳性表达率差异显著(均为 $P < 0.01$). 但潜在恶性和恶性之间的表达率无显著差别(表 1).

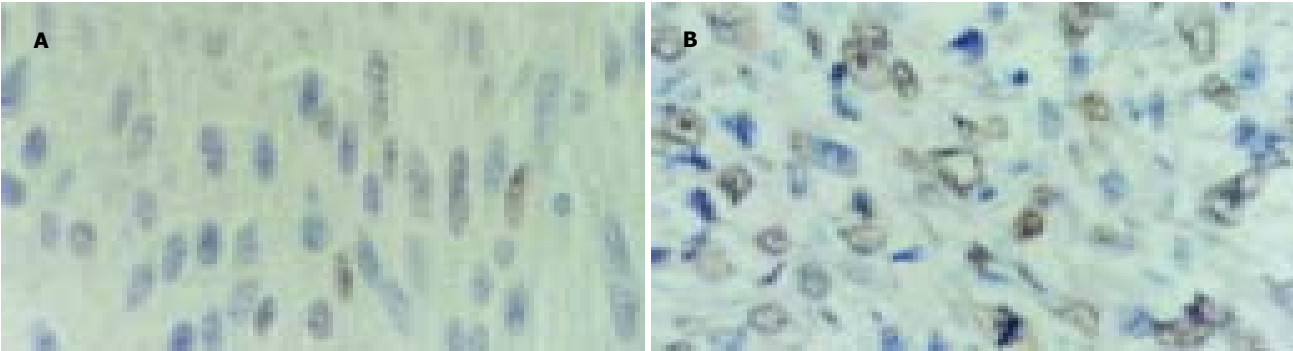


图 1 GIST 中 p21WAF1 阳性表达, 细胞核内见阳性物质沉积, SPX400. A: 良性; B: 恶性.

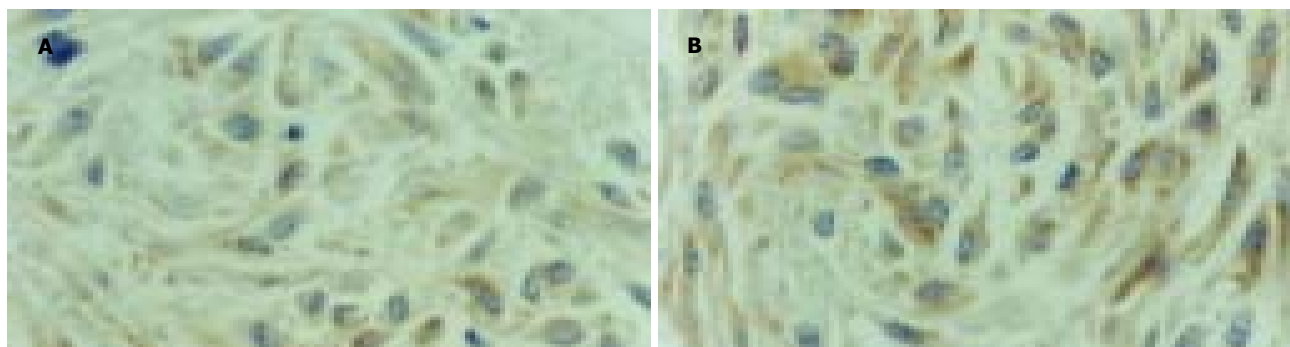


图2 GIST中Bax阳性表达,胞质内见阳性物质沉积,SP×400. A:潜在恶性; B:恶性.

2.3 p21WAF1和Bax表达的相关性 p21WAF1和Bax在GIST中表达呈正相关. 根据Kappa值,二者一致性较好($r = 0.448$, $\chi^2 = 8.021$, $P = 0.005$, $Kappa = 0.447$, 表2).

表2 GIST中p21WAF1和Bax表达的相关性

p21WAF1	n	Bax	
		+	-
+	21	16	5
-	19	6	13

$r = 0.448$, $P = 0.005 < 0.01$.

3 讨论

光镜下,胃肠道间质瘤的肿瘤细胞在形态上很象平滑肌瘤和神经鞘瘤^[6]. 基于分子和免疫组织学特征,以往诊断为平滑肌瘤、神经鞘瘤、平滑肌肉瘤的胃肠道间叶源性肿瘤现在很多都划归胃肠道间质瘤^[7]. GIST源于消化道卡哈尔细胞或卡哈尔细胞和平滑肌细胞的前体细胞^[8],免疫组化染色显示胃肠道肠肌间神经丛周围细胞 *c-kit* (CD117)和CD34阳性^[9]. 因为GIST特征性的表达CD117和CD34^[10],所以可用于GIST的诊断. GIST大多数发生在胃(60–70%)和小肠(20–30%)^[11],在本研究中,发生在胃的占37.5%,小肠占25.0%. 此外发生在食管和肠系膜共12例.

虽然 *c-kit* 作为一种胃肠道间质瘤特异而敏感的标记物,对GIST的诊断及鉴别诊断有重要的意义,但其不能作为GIST分化程度的指标^[12]. 除转移和浸润外,肿瘤性坏死、核分裂象大于10/50 HPF、细胞密集明显异型等提示恶性,此外,术中粘连、瘤体直径大于5 cm,核分裂象大于5/50 HPF,可作为良恶性的参考指标^[13]. 但有效而持久的良恶性参考指标仍不清楚^[14].

p21WAF1作为周期素依赖激酶的抑制物^[15],可以负性调节cdk的功能,使细胞周期停滞在G₁期^[16–17]. 因此,目前认为p21WAF1作为肿瘤抑制基因,在肿瘤的发生发展中起重要作用. 在一些恶性肿瘤中常表现为p21WAF1表达减少^[18]. 我们发现, p21WAF1表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、组织学分型、大小、

有无坏死无关,与组织学分级有关. 在潜在恶性和恶性GIST中表达较高(均为80.0%),而在良性GIST表达较低(6.7%),说明在肿瘤的良性阶段,即早期阶段p21WAF1不发挥作用,而在GIST的潜在恶性和恶性阶段发挥作用. 与Pindzola *et al*^[19]报告恶性GIST表达p21WAF1结果有一致性,但潜在恶性和恶性的GIST之间无统计学意义($P > 0.05$). 我们推测p21WAF1表达高可能有助于遏制GIST中肿瘤细胞的无限增生,肿瘤表现为生长缓慢. 因此,检测GIST组织中p21WAF1表达水平有助于了解GIST的生物学行为和预后. 由于良性的GIST表达很低,我们可以认为p21WAF1表达高提示增加了恶性潜能,因此p21WAF1有可能成为评价GIST恶性潜能的一个有用指标.

细胞凋亡是细胞接受刺激信号后一种主动的、由凋亡基因控制的细胞程序性死亡方式^[20]. Bcl-2蛋白家族包括促凋亡蛋白(Bax, Bid, Bad和Bak)和抗凋亡蛋白(Bcl-2和Bcl-xl)^[21]. Bax作为Bcl-2蛋白家族的一员,可以发挥促凋亡作用. 以往的研究显示结直肠癌中Bax的表达与其分化和组织学类型有关^[22]. Chao *et al*^[23]认为在子宫内膜癌中,随着组织学分级的增加, Bax的表达相应增加. 也有报道Bax在侵袭性癌中表达高于异型增生和正常组织^[24]. 许多学者已研究了凋亡在癌或淋巴瘤中的表达与肿瘤的分级有关,但很少有人研究凋亡与间叶性肿瘤的关系^[25]. 有人认为端粒酶活性、细胞凋亡与GIST良恶性有关^[26]. Noguchi *et al*^[27]认为在GIST中, Bax表达在良性和恶性GIST中没有统计学意义. 但本研究表明,在潜在恶性和恶性GIST中表达较高(90.0%, 80.0%),而在良性GIST表达较低(6.7%),说明在肿瘤的良性阶段,即早期阶段Bax不发挥作用. 而在GIST的潜在恶性和恶性阶段发挥作用,但潜在恶性和恶性的GIST之间无统计学意义($P > 0.05$),说明Bax基因参与GIST的增生和凋亡,随着GIST由良性向恶性转变的过程中,在细胞恶性增生更加活跃的同时,细胞自发凋亡也增加,肿瘤亦具有更强的侵袭转移能力. 由于良性GIST表达很低,因此,我们可以认为Bax表达高提示增加了恶性潜能. 因此Bax有可能成为评价GIST恶性潜能的一个有用指标.

尚鸣异 *et al*^[28]认为p21WAF1基因可诱导平滑肌细胞

凋亡, 从而对平滑肌细胞增生起抑制作用, p21WAF1 与细胞凋亡密切相关. 也有研究认为存在 p53-p21^{WAF1/CIP1} 依赖途径, 通过上调 p21WAF1 蛋白的表达来诱导细胞凋亡^[29]. 但也有报道 p21WAF1 可同时抑制增生和凋亡^[30-31]. 但 p21WAF1 和 Bax 在 GIST 中的关系目前还未见报道, 我们发现 p21WAF1 和 Bax 表达呈正相关 ($r=0.448$, $P=0.005$, $Kappa=0.447$), 提示 p21WAF1 和 Bax 密切相关, 我们推测 p21 基因可能通过调节促凋亡基因 Bax 的水平来诱导凋亡, 且主要在 GIST 的潜在恶性和恶性阶段发挥作用. 但也有可能除了 p21 基因以外其他因素调节 Bax 的表达, 或者二者在 GIST 由良性向恶性转变过程中起协同作用. 总之, 相关机制尚不甚清楚, 有待进一步研究.

4 参考文献

- Duensing A, Heinrich MC, Fletcher CD, Fletcher JA. Biology of gastrointestinal stromal tumors: KIT mutations and beyond. *Cancer Invest* 2004;22:106-116
- Kim TW, Lee H, Kang YK, Choe MS, Ryu MH, Chang HM, Kim JS, Yook JH, Kim BS, Lee JS. Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:3076-3081
- Lin SC, Huang MJ, Zeng CY, Wang TI, Liu ZL, Shiy RK. Clinical manifestations and prognostic factors in patients with gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2003;9:2809-2812
- Gelen T, Elpek GO, Aksoy NH, Ogus M, Keles N. p27 Labeling index and proliferation in gastrointestinal stromal tumors: correlations with clinicopathologic factors and recurrence. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:346-352
- Tornoczky T, Kover E, Pajor L. Frequent occurrence of low grade cases among metastatic gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2003;56:363-367
- Liu P, Na J, Wang Y, He Q, Zhang Y, Tang X, Zou W. Study of gastrointestinal stromal tumors by light microscopy, electron microscopy and immunohistochemistry. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2002;31:199-203
- Bucher P, Villiger P, Egger JF, Buhler LH, Morel P. Management of gastrointestinal stromal tumors: from diagnosis to treatment. *Swiss Med Wkly* 2004;134:145-153
- Ray-Coquard I, Le Cesne A, Michallet V, Boukovinas I, Ranchere D, Thiesse P, Baty V, Blay JY. Gastro-intestinal stromal tumors: news and comments. *Bull Cancer* 2003;90:69-76
- Wang L, Vargas H, French SW. Cellular origin of gastrointestinal stromal tumors: a study of 27 cases. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1471-1475
- Boggino HE, Fernandez MP, Logrono R. Cytomorphology of gastrointestinal stromal tumor: diagnostic role of aspiration cytology, core biopsy, and immunochemistry. *Diagn Cytopathol* 2000;23:156-160
- 高冬霞, 孟凡农, 田旭阳, 杨京萍, 凌云, 廖松林. 胃肠道间质瘤的临床病理研究. *中华普通外科杂志* 2003;18:345-347
- 刘晓红, 马大烈, 吴丽莉, 白辰光, 胡宏杰. 原癌基因 c-kit 在胃肠道间质瘤中的表达及其临床意义. *中华外科杂志* 2002;40:277-279
- 侯英勇, 王坚, 朱雄增, 杜祥, 孙孟红, 郑爱华. 胃肠道间质瘤 76 例的临床病理及免疫组织化学特征. *中华病理学杂志* 2002;31:20-25
- Kim MK, Lee JK, Park ET, Lee SH, Seol SY, Chung JM, Kang MS, Yoon HK. Gastrointestinal stromal tumors: clinical, pathologic features and effectiveness of new diagnostic criteria. *Korean J Gastroenterol* 2004;43:341-348
- Okamoto K, Kato S, Arima N, Fujii T, Morimatsu M, Imaizumi T. Cyclin-dependent kinase inhibitor, p21Waf1, regulates vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Hypertens Res* 2004;27:283-291
- 肖卫东, 陈伟, 葛海燕, 陈祖林. ALA-PDT 对 SW480 结肠癌细胞周期阻滞作用及对 G1/S 关卡调控因子的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:1048-1052
- 于卉影, 孙利平, 孙黎光, 丁晓慧. bFGF 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长调控. *世界华人消化杂志* 2003;11:1333-1336
- Migaldi M, Sgambato A, Garagnani L, Ardito R, Ferrari P, De Gaetani C, Cittadini A, Trentini GP. Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. *Clin Cancer Res* 2000;6:3131-3138
- Pindzola JA, Palazzo JP, Kovatich AJ, Tuma B, Nobel M. Expression of p21WAF1/CIP1 in soft tissue sarcomas: a comparative immunohistochemical study with p53 and Ki-67. *Pathol Res Pract* 1998;194:685-691
- 徐细明, 于皆平, 何小飞, 李军华, 郑敏, 於亮亮. 大蒜素对大鼠溃疡性结肠炎淋巴细胞凋亡及其调控蛋白的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:565-568
- van der Woude CJ, Kleibeuker JH, Tiebosch AT, Homan M, Beuving A, Jansen PL, Moshage H. Diffuse and intestinal type gastric carcinomas differ in their expression of apoptosis related proteins. *J Clin Pathol* 2003;56:699-702
- Jansson A, Sun XF. Bax expression decreases significantly from primary tumor to metastasis in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:811-816
- Chao H, Sun J, Lu S. Bax gene expression in endometrial carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:214-216
- Li SM, Yao SK, Yamamura N, Nakamura T. Expression of Bcl-2 and Bax in extrahepatic biliary tract carcinoma and dysplasia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2579-2582
- Liu Y, Chen C, Chen C, Hsieh H, Chang C, Shyu J, Yen C, Harn H. Apoptosis and Fas-ligand expression correlate to the histopathological grade of gastric smooth muscle tumors. *J Surg Res* 2001;95:92-98
- 王强, 孙威, 秦晔, 于泽成, 朱健. 胃肠道间质瘤端粒酶活性与细胞凋亡及 P53、Bcl-2 表达的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12:995-997
- Noguchi T, Sato T, Takeno S, Uchida Y, Kashima K, Yokoyama S, Muller W. Biological analysis of gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Rep* 2002;9:1277-1282
- 尚鸣昇, 王建华, 周康荣, 卢大儒, 胡美玉, 李文涛, 谢倩. 腺病毒介导的 P21^{WAF1/CIP1} 基因诱导血管平滑肌细胞凋亡. *临床放射学杂志* 2002;21:388-391
- 张桂英, 徐美华, 谢兆霞, 何春梅. 吡嗪美辛对野生型 p53 转染的结肠癌细胞株 SW480 的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:1706-1710
- Rau B, Sturm I, Lage H, Berger S, Schneider U, Hauptmann S, Wust P, Riess H, Schlag PM, Dorken B, Daniel PT. Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol* 2003;21:3391-3401
- Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002;1:639-649

^{13}C -噤塞西啶呼气试验检测肝脏贮备功能

贾绮宾, 梁学亚, 吴改玲, 蓝宇, 王 玘, 李 宪, 王曼维

贾绮宾, 梁学亚, 吴改玲, 蓝宇, 北京积水潭医院消化内科 北京市 100035
王玘, 北京积水潭医院内窥镜室 北京市 100035
李宪, 北京积水潭医院统计室 北京市 100035
王曼维, 北京积水潭医院医务部 北京市 100035
贾绮宾, 女, 1957-08-26 生, 北京市人, 汉族, 1983 年北京医学院学士, 副教授, 副主任医师, 主要从事胃肠道疾病及肝病的临床研究。
项目负责人: 贾绮宾, 100035, 北京市西城区新街口东街 31 号, 北京积水潭医院消化内科。
电话: 010-66167631-6289
收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-08-25

^{13}C - mthacetin breath test for assessment of liver functional capacity

Qi-Bin Jia, Xue-Ya Liang, Gai-Ling Wu, Yu Lan, Qi Wang, Xian Li, Man-Wei Wang

Qi-Bin Jia, Xue-Ya Liang, Gai-Ling Wu, Yu Lan, Department of Gastroenterology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China
Qi Wang, Department of Endoscopy, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China
Xian Li, Department of Statistics, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China
Man-Wei Wang, Department of Medical Affairs, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China
Correspondence to: Dr. Qi-Bin Jia, Department of Gastroenterology, Beijing Jishuitan Hospital, 31 Xijiekou East Street, West District, Beijing 100035, China.
Received: 2004-07-20 Accepted: 2004-08-25

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of ^{13}C -mthacetin breath tests for assessment and the classification of liver functional capacity.

METHODS: Twelve healthy volunteers served as a control group. Patients (test group) with different kinds of liver diseases were divided into 4 sub-groups: compensatory period ($n=4$), Child-Pugh classification A, B, C ($n=12, 12, 16$, respectively). Patients in both groups were examined for liver function by a biochemical test after orally taking ^{13}C -mthacetin (75 mg). Gas breathed out was collected at 9 different time within 120 min. The samples were analyzed with mass spectrograph to obtain DOB, MV and CUM curves and CUM120 value.

RESULTS: Biochemical index such as ALB and pre-albumin (PA) in patients of test group (Child-Pugh A, B and C) were significantly decreased as compared with those in patients of control group (ALB: $33.1 \pm 3.1, 29.3 \pm 6.5, 27.9 \pm 5.0$ vs 36.6 ± 4.7 ; PA: $119.7 \pm 51.0, 104.3 \pm 21.1, 77.4 \pm 32.9$ vs 176.4 ± 68.2 ; $P < 0.05$). The classifications of liver capacity significantly related to the values of ALB and PA ($P < 0.05$). Peak values of DOB and MV curves negatively related to the peak time in the test group (DOB: $r = -0.48, P < 0.01$;

MV: $r = -0.57, P < 0.01$). Peak values of DOB, MV and CUM decreased with the development of liver dysfunction. Significant difference existed between the test group (Child-Pugh A, B, and C respectively) and control group (DOB: $10.4 \pm 3.39, 6.71 \pm 3.58, 4.00 \pm 1.40$ vs 20.93 ± 7.56 ; MV: $13.12 \pm 9.51, 11.61 \pm 8.02, 10.20 \pm 4.99$ vs 29.53 ; CUM: $18.09 \pm 18.09, 16.60 \pm 16.60, 15.82 \pm 15.82$ vs 30.67 ± 2.85 ; $P < 0.05$ respectively). CUM₁₂₀ values in patients of the test group (Child-Pugh A, B, and C) significantly decreased as compared with those in patients of control group ($63.61 \pm 36.67, 59.32 \pm 24.73, 52.62 \pm 23.92$ vs 109.45 ± 10.26 ; $P < 0.05$), but no significant decrease appeared among sub-groups.

CONCLUSION: ^{13}C -mthacetin breath test is a safe, effective method in assessment and classification of liver capacity. Mean peak values of DOB, MV and CUM curves and CUM₁₂₀ value decrease with the development of liver dysfunctions. Peak values are more clinically significant than peak time.

Jia QB, Liang XY, Wu GL, Lan Y, Wang Q, Li X, Wang MW. ^{13}C -mthacetin breath test for assessment of liver functional capacity. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11):2646-2650

摘要

目的: 探讨 ^{13}C -噤塞西啶呼气试验与肝功能生化检测及肝功能分级的关系。

方法: 12 名健康志愿者做正常对照组, 44 例各种肝病患者分为肝功能正常组及 Child-Pugh A、B、C 组, 每人均做血生化肝功能检测并空腹口服 ^{13}C -噤塞西啶 75 mg 后, 在 120 min 内 9 个时间点收集呼出气体, 利用呼气质谱仪作出 DOB、MV、CUM 曲线及 CUM120 数值。

结果: 在肝脏功能的诸项指标中血清白蛋白(ALB)和前白蛋白(PA)数值在肝病组与健康对照组相比具有统计学意义 (ALB = 30.7 ± 5.0 g/L, $t = 3.68, P < 0.05$; PA = 102.5 ± 44.0 IU/L, $t = 3.7, P < 0.05$)。肝贮备功能量化分级与血清白蛋白及前白蛋白数值具有明显相关性。试验组 DOB、MV 曲线峰值及峰值出现时间呈负相关。DOB 曲线 (Child A = 10.4 ± 3.4 , Child B = 6.7 ± 3.6 , Child C = $4.0 \pm 1.4\%$, $F = 14.89, P = 0.00 < 0.01$)、MV 曲线 (Child A = 13.1 ± 9.5 , Child B = 11.6 ± 8.0 , Child C = 10.2 ± 5.0 , $F = 11.09, P = 0.00 < 0.01$) 及 CUM 曲线 (Child A = 18.1 ± 10.1 , Child B = 16.6 ± 6.9 , Child C = $15.8 \pm 7.6\%$, $F = 8.02, P = 0.00 < 0.01$) 峰值随肝功能减退而降低, 对照组与肝功能失代偿期各组差异具有统计学意义。累积丰度 (CUM120) 对照组与肝功能失代偿期各组差异具有统计学意义 (Child A =

63.6 ± 36.7 , ChildB = 59.3 ± 24.7 , ChildC = 52.6 ± 23.9 , $q = 5.6, 12.6, 4.8$, P 值均 <0.05).

结论: DOB、MV 及 CUM 曲线平均峰值及 CUM120 数值随肝功能损害加重而逐渐降低. 在评价肝贮备功能时, 曲线峰值出现时间与峰值高度相比峰值高度更具有临床意义. ^{13}C -噤塞西啖呼气试验安全、无创, 有利于量化肝贮备功能.

贾绮宾, 梁学亚, 吴改玲, 蓝宇, 王圻, 李宪, 王曼维. ^{13}C -噤塞西啖呼气试验检测肝脏贮备功能. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2646-2650

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2646.asp

0 引言

临床上广泛应用的肝功能生化检测对于了解肝细胞是否有损害以及损害程度确有重要意义, 但其不能特异、量化地反映肝细胞的贮备情况. 1970年代有研究者尝试用 ^{14}C 或 ^{13}C -呼气试验测定肝病患者的药物定量肝代谢功能、诊断肝脏疾病、随访疗效、估计预后. 近年来, 应用 ^{13}C 呼气试验测量肝细胞储备功能在国际上越来越受到广泛重视, 由于其能获得完全量化的数据, 而受到患者和临床医生的好评^[1]. 用稳定性核素 ^{13}C 标记底物进行呼气试验检测肝功能, 他可以通过测量呼气中 ^{13}C 的含量来反映肝脏代谢功能状况和肝细胞的损伤程度, 并因有安全^[2]、定量、可重复性应用的特点而受到广泛重视, 并已取得了一定经验^[3-7]. 我们应用 ^{13}C 噤塞西啖呼气试验(^{13}C -mithacetin breath test, ^{13}C -MBT)检测肝脏细胞贮备功能, 并与肝功能生化检测及Child-Pugh肝功能分级进行对比, 以评价 ^{13}C 噤塞西啖呼气试验的临床符合率及应用价值.

1 材料和方法

1.1 材料 对照组为12名健康者, 男10名, 女2名. 年龄35-70岁, 平均46.9岁. 无慢性肝病及其他慢性病史, 近期无发热, 无长期服药史及烟酒嗜好. 肝功能生化及免疫学检查各项指标均正常, 肝脾B型超声无异常征象. 试验组: 为2002-08/2003-12我院消化内科住院的肝病患者44例, 其中乙肝后肝硬化19例, 酒精性肝硬化6例, 乙肝后肝硬化合并肝癌6例, 血吸虫性肝硬化2例, 肝癌2例, 慢性活动性乙型肝炎1例, 丙型肝炎1例, 戊型肝炎1例, 脂肪肝1例, 自身免疫性肝炎并肝硬化1例, 胆汁淤积性肝硬化3例, 中毒性肝炎1例. 男28例, 女16例, 年龄41-85岁, 平均年龄62.1岁. 按照Child-Pugh分级法^[4]肝功能代偿期4例, 失代偿期40例, 其中A级12例, B级12例, C级16例. 血清白蛋白 $>35\text{ g/L}$ 13例, $28-35\text{ g/L}$ 16例, $<28\text{ g/L}$ 15例. 美国Isotec Inc公司提供 ^{13}C -mithacetin原料, 北京嘉汇彬医药技术有限公司提供 ^{13}C -Mithacetin 75 mg的口服诊断制剂, 纯度: 99%. 试验仪器为北京嘉汇彬医药

技术有限公司提供的中国科学院科学技术发展有限责任公司研制的中科科仪ZHP-2001型 ^{13}C 呼气质谱仪.

1.2 方法 所有入选病例常规做血常规、ALT、AST、TBIL、DBIL、血清总蛋白(TSP)、血清白蛋白(ALB)、前白蛋白(PA)、碱性磷酸酶(AKP)、GGT、凝血酶原时间(PT)、凝血酶原活动度(PA)、活化的部分凝血活酶时间(APTT). 均做腹部B型超声, 观察肝脏、脾脏、门静脉及腹水情况, 同时进行门静脉主干及脾静脉测量, 并配合上消化道造影或内镜检查了解有否食管和胃底静脉曲张情况. 部分病例做肝穿刺活组织检查. 受试者于试验前至少禁食禁水8h, 受试过程在安静状态下进行. 拧开收集试管上的试管盖, 将吸管置入试管底部, 在正常呼吸状态下, 用吸管向试管底部吹气, 要求不间断吹气4-8s, 在吹气的同时, 缓慢撤出吸管, 在吸管撤出试管的同时立即拧上试管盖, 此标本为0时相空白标本. 将 ^{13}C 噤塞西啖75 mg充分溶于100 mL白开水中, 随后患者快速全部饮入 ^{13}C 噤塞西啖水溶液, 在饮入该溶液后10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 min分别按前述方法收集呼出的气体, 要求试管内采集的气体量充足, 统一送检. 测量(1)DOB (Delta over baseline)曲线: 记录不同时刻呼气中 $^{13}\text{CO}_2$ 丰度, 计算各时间段的DOB值. (2)代谢速率(MV)曲线: 记录不同时刻 $^{13}\text{CO}_2$ 的呼出速率. 具体表示为某一时刻呼出的 $^{13}\text{CO}_2$ 的丰度占全部应呼出量的 $^{13}\text{CO}_2$ 丰度的百分比. (3)累积丰度(CUM)曲线: 记录在某一时刻前累积呼出的 $^{13}\text{CO}_2$ 的丰度总和, 即在某一时刻前呼出的累积量占应呼出总量的百分比. (4)CUM120: 反映肝细胞代偿功能, 为肝脏代偿指数. $\text{CUM120} = \text{患者}120\text{ min}^{13}\text{CO}_2\text{累积呼出丰度} \div \text{正常值}(28)$.

统计学处理 应用PEMS3.1 for windows系统, 指标值用平均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 组间对比分别采用 t 、 F 检验, 组间比较采用 q 检验, 样本构成采用 χ^2 检验. 应用秩和检验进行多组均数的显著性检验. $P<0.05$ 差异具有显著性.

2 结果

肝病患者血清ALB, 前白蛋白(PA)与健康对照组相比差异具有显著性(肝病患者 $\text{ALB}=30.7 \pm 5.0\text{ g/L}$, $t=3.68$, $P<0.05$; $\text{PA}=102.5 \pm 44.0\text{ IU/L}$, $t=3.7$, $P<0.05$). 而血常规, ALT, AST, TBIL, DBIL, TSP, APTT由于其影响因素较多, 健康对照组与肝病组差异无显著性(表1). 肝病患者血清 $\text{ALB}>35\text{ g/L}$ 组13例中符合量化分级正常和Child-PughA级者10例(分级符合率为76.9%), $28-35\text{ g/L}$ 组16例中符合Child-PughB级者12例(75.0%), $<28\text{ g/L}$ 组15例中符合Child-PughC级者12例(80.0%). 同时血清 $\text{ALB}>35\text{ g/L}$ 组中 $\text{PA}>150\text{ IU/L}$ 者占84.6%(11/13), $<28\text{ g/L}$ 组中PA在 $<80\text{ IU/L}$ 者占86.7%(13/15), $28-35\text{ g/L}$ 组中PA在 $80-150\text{ IU/L}$ 者占81.3%(13/16). 提示肝贮备功能量化分级与血清白蛋白和前白蛋白数值具有明显相关性. (表2).

表1 肝病患者不同储备功能状态下肝功能状况(mean±SD)

项目	对照组	A级	B级	C级
PLT (10 ⁹ /L)	159.8±84.7	143.6±85.1	126.7±92.7	110.8±65.9
ALT (IU/L)	60.8±58.1	142.5±299.8	28.3±10.3	85.7±62.3
AST (IU/L)	56.0±30.6	141.6±236.1	41.8±17.3	153.0±138.1
ALP (IU/L)	129.6±145.8	175.4±133	114.3±84.5	108.4±71.3
GGT (IU/L)	183.7±262.2	240.2±230.8	105.5±71.8	125.3±163.6
TBIL(IU/L)	27.7±57.3	57.9±99.6	17.2±9.5	65.4±70.9
ALB (g/L)	36.6±4.7	33.3±3.1	29.3±6.5	27.9±5.0
PA (IU/L)	176.4±68.2	119.7±51.0	104.3±21.1	77.4±32.9
PT (s)	13.9±2.2	14.3±1.43	14.7±1.1	20.15±7.8
APTT (s)	29.8±4.3	84.9±14.2	82.9±15.8	67.1±23.0

ALB, PA, PT, APTT: 均 $P<0.05$ vs 对照组。

表2 血浆白蛋白和前白蛋白与肝功能分级的关系

指标	n	正常, ChildA	B	C
ALB > 35 g/L	13	10	2	1
28-35 g/L	16	2	12	2
< 27 g/L	15	0	2	13
符合率 %		76.9	75.0	80.0
PA > 150 IU/L	13	11	1	1
80-150 IU/L	16	1	13	2
< 80 IU/L	15	0	2	13
符合率(%)		84.6	81.3	86.7

2.1 曲线峰值与时间 对照组 DOB 曲线、MV 曲线均为单峰曲线, 试验各组曲线峰值与峰值出现时间均呈负相关(表3)。DOB 曲线: 对照组为单峰曲线, 平均峰值为 20.9%, 峰值出现时间平均为服药后 30.7 min。肝功能代偿期组、Child-Pugh A, B, C 组的 DOB 曲线平均最高峰值较对照组依次降低。峰值出现时间 Child-Pugh B 及 Child-Pugh C 较对照组明显延长, Child-Pugh C 组曲线甚至峰值不突出, 曲线始终低平。经统计学分析, 肝功能代偿期组平均峰值较对照组降低, 但经统计学分析差异无显著性。肝功能失代偿期各组与对照组平均最高峰值相比依次降低, 有明显下降趋势, 差异具有极显著性(ChildA = 10.4 ± 3.4 , ChildB = 6.7 ± 3.6 , ChildC = $4.0 \pm 1.4\%$, $F=14.89$, $P=0.00<0.01$)。MV 曲线: 对照组与试验组相比, 随平均峰值降低肝功能水平下降, 对照组与试验组相比差异具有极显著性(ChildA = 13.1 ± 9.5 , ChildB = 11.6 ± 8.0 , ChildC = 10.2 ± 5.0 , $F=11.09$, $P=0.00<0.01$), 而试验组两两相比虽平均最高峰值明显降低, 但统计学分析差异无显著性。CUM 曲线: 对照组峰值出现时间平均 29.3 min, 平均峰值 30.7%, 肝功能代偿期与 Child-Pugh A, B, C 各组平均峰值为 20.0, 18.1, 16.6, 15.8%。峰值出现最短时间为 10 min, 最长时间为 100 min。平均出现时间为 52.33 min, Child-Pugh B、Child-Pugh C 组与对照组平均峰值相比显著

降低, 差异具有极显著性(ChildA = 18.1 ± 10.1 , ChildB = 16.6 ± 6.9 , ChildC = 15.8 ChildC = 7.6% , $F=8.02$, $P=0.00<0.01$)。而试验组中随肝功能变差平均峰值降低, 但组间两两相比差异均无显著性。(表4, 图1)。

表3 肝病患者时间与曲线峰值的关系

曲线	正常组				肝功异常组			
	时间(s)	峰值	r	P	时间(s)	峰值	r	P
DOB	30.7	14.9%	-0.5	>0.05	52.3	8.3%	-0.5	<0.01
MV	29.3	18.5%	-0.6	<0.05	52.3	10.4%	-0.6	<0.01

表4 临床分级与 DOB 曲线峰值的关系(mean±SD)

分组	DOB 曲线(%)	MV 曲线(%)	CUM 曲线(%)	CUM120(%)
对照组	20.9±7.6	29.5±5.9	30.7±2.9	109.5±10.3
代偿期组	16.7±8.2	15.5±7.7	20.0±6.2	71.4±22.0
失代偿期				
ChildA	10.4±3.4	13.1±9.5	18.1±10.1	63.6±36.7
ChildB	6.7±3.6	11.6±8.0	16.6±6.91	59.3±24.7
ChildC	4.0±1.4	10.2±5.0	15.8±7.6	52.6±23.9

$P<0.05$, 对照组 vs 代偿期组, ChildA, ChildB 和 Child C。

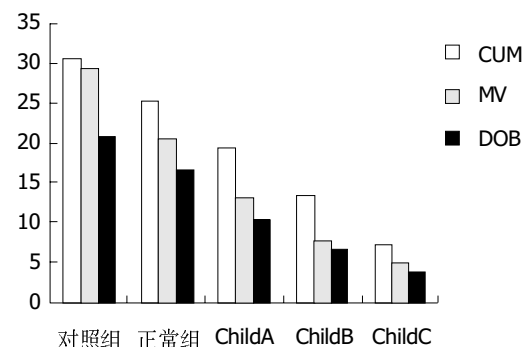


图1 肝功能不同功能状态下3种曲线平均峰值趋势。

2.2 临床分期与曲线峰值的关系 DOB 曲线、MV 曲线、CUM 曲线平均峰值随肝功能减退而降低, 峰值出现时间显著延长。肝功能正常组与失代偿期各组相比差异具有显著性。(表4)。

2.3 临床分期与累积丰度 CUM120 的关系 对照组 CUM120 平均峰值为 109.5%, 试验组中肝功能代偿期、Child-Pugh A, B, C 级平均累积丰度分别为 71.42, 63.61, 59.32, 52.62%, 对照组与肝功能正常者、Child-Pugh A, B, C 各组相比差异具有显著性($q=5.6, 12, 6, 4.8$, P 均 <0.05), 而试验组间两两对比虽平均峰值有逐渐下降趋势, 但经统计学处理差异无显著性(表4)。

3 讨论

临床上通常应用 Child-Pugh 评价系统对肝病患者进行肝功能分级, 该评价系统通过临床表现和血液化验对肝脏功能进行评估, 他是目前临床上被广泛接受的反

映肝细胞损害和肝脏功能状态的指标. 然而Child-Pugh评价系统并不能有效地对肝脏功能进行量化评估^[8]. 而用稳定性核素 ^{13}C 标记底物进行呼气试验对肝功能进行定量分析, 便使得临床医生对患者肝功能的评估有了客观上的指标, 目前国内外已取得了一定经验^[9-15]. 临床研究表明, ^{13}C 呼气试验已经成为评价肝脏功能的一种具有潜能的定量评价即刻肝脏功能的有用工具. 有研究指出, ^{13}C -Methacetin呼气试验能够可靠、无侵入性地区别健康人群和肝硬化患者, 因而这个试验适用于量化分析肝脏功能^[16-17].

^{13}C 噉塞西啉(^{13}C -methacetin)作为呼气试验的试剂具有相当多的优势, 口服后经肠道吸收, 通过血液循环进入肝脏, 在肝脏细胞微粒体混合功能氧化酶系统(细胞色素P450)作用下氧化脱甲基, 生成 $^{13}\text{CO}_2$ 和对乙酰氨基酚(acetaminophen), $^{13}\text{CO}_2$ 随血循环至肺脏, 由呼气排出体外. 在体内可以快速清除^[18-19]. 本试验系通过该机制将呼出的 $^{13}\text{CO}_2$ 收集起来, 通过气体同位素质谱仪测定和分析 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比值速率、累积丰度等反映肝细胞的储备数量和代谢功能.

任何原因引起肝细胞损伤, 使有效肝细胞数量减少, 即可使肝细胞微粒体混合功能氧化酶系统(细胞色素P450)的功能受到不同程度的影响, 使其氧化去甲基化能力下降, 从而表现为 $^{13}\text{CO}_2$ 的总回收率下降. 有研究报道, $^{13}\text{CO}_2$ 回收率的下降与肝病的严重程度的增加相关, 在肝硬化患者中随着肝功能的减退 $^{13}\text{CO}_2$ 的回收量显著降低^[20-23], 而 $^{13}\text{CO}_2$ 峰值出现是在检测15-30 min处获得^[24-26]. 本研究中对对照组的峰值出现最佳时间在服药后20-30 min内, 而试验组则在20-40 min内. ^{13}C -methacetin呼气试验中呼出的 $^{13}\text{CO}_2$ 用DOB值表示, 该值可作为评价肝细胞失调的参数. DOB值降低是由于慢性肝炎时肝细胞损害, 肝纤维化. 肝损害越重, 数值越低. 慢性肝炎患者该值与肝组织炎症、纤维化分级和Child-Pugh评分明显相关. 慢性活动性肝炎较慢性迁延性肝炎DOB值降低更明显^[27]. 我们发现, 在评价肝储备功能时, 曲线峰值出现时间与峰值高度相比峰值高度更具有临床意义. 同时发现Child-Pugh分级与 ^{13}C -methacetin呼吸试验的肝储备功能量化分级具有一定相关性, 表现为DOB曲线、MV曲线及CUM曲线平均峰值及CUM120累计丰度其数值随肝功能减退而递减, 峰值出现时间则随肝病严重程度而延长, 我们认为峰值在20-40 min内出现有意义, 出现时间过长提示肝脏功能异常. 其中曲线峰值及CUM120与临床分级具有一定相关性. 因此, 我们认为综合分析DOB曲线、MV曲线以及CUM120的峰值高度以及峰值出现时间可以比较实际地指导肝功能的临床分级. 同时, 可以根据峰值的高度区分肝功能正常者及肝功能失代偿期患者.

我们发现, Child-Pugh量化分级与血清白蛋白和前白蛋白含量具有相关性. 肝脏是生成白蛋白的惟一器官, 血浆白蛋白可反映肝脏合成功能, 代表肝的储备功

能. 因此我们就可以利用测定肝脏合成白蛋白的能力来评估肝细胞功能的损伤程度. 白蛋白在血浆中的半衰期约为15-19 d, 因此当肝脏病变达到一定病程、发展到一定程度时即可出现血浆白蛋白的降低. 有文献报道, 肝储备功能至少损失60-70%以上时肝细胞合成功能才出现失代偿^[28]. 前白蛋白(PA)是由肝细胞合成, 存在于血浆中的一种急性反应蛋白. 血清蛋白电泳测定时PA位于白蛋白前, 其半衰期为12 h, 因此测定血清中前白蛋白比白蛋白反映肝脏损害灵敏^[29]. 有研究显示前白蛋白在各型肝炎、肝硬化及酒精性肝病患者血中水平下降, 对判断肝储备功能有一定意义, 在判断营养状态和肝脏功能方面比白蛋白更灵敏和更为及时的一个指标. 在本试验中我们发现, 血浆白蛋白和前白蛋白的数值与肝储备功能的量化分级有一定的相关性, 在符合肝储备功能的量化分级正常及A级中, 血浆白蛋白 $>35\text{ g/L}$ 者占76.9%, B级中白蛋白在 $28-35\text{ g/L}$ 者占75%, C级中白蛋白 $<28\text{ g/L}$ 者占80%. 同时发现, A级中前白蛋白 $>150\text{ IU/L}$ 者占84.6%, B级中前白蛋白 $80-150\text{ IU/L}$ 者占81.3%(13/16), C级中前白蛋白 $<80\text{ IU/L}$ 者占86.7%(13/15). 提示肝储备功能量化分级与血清白蛋白和前白蛋白数值具有明显相关性.

^{13}C -噉塞西啉呼气试验为无创性检查, 即避免了患者对抽血的精神负担, 又免除了扎针的痛苦, 是一种安全、无痛的检测手段. 他对肝脏功能的检查具有特异性, 能定量的反映肝脏的储备功能, 有助于肝脏功能的临床分级, 并对临床治疗和判断预后具有很好的指导意义.

4 参考文献

- 1 Becker M. ^{13}C breath tests for measurement of liver function. *Gut* 1998;43(Suppl 3):S25-S27
- 2 Lara Baruaque S, Razquin M, Jimenez I, Vazquez A, Gisbert JP, Pajares JM. ^{13}C -phenylalanine and ^{13}C -Methacetin breath test to evaluate functional capacity of hepatocyte in chronic liver disease. *Dig Liver Dis* 2000;32:226-232
- 3 孙大裕, 严惟力, 蒋义斌, 孙旭, 刘兴党, 汪雁鹤, 林祥通. 苯丙氨酸呼气试验定量检测肝功能分析参数研究. *中华消化杂志* 2003;23:399-402
- 4 Petrolati A, Festi D, De Berardinis G, Colaiocco-Ferrante L, Di Paolo D, Tisone G, Angelico M. ^{13}C -Methacetin breath test for monitoring hepatic function in cirrhotic patients before and after liver transplantation. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:785-790
- 5 Kobayashi T, Imamura H, Takayama T, Makuuchi M. The role of preoperative phenylalanine breath test in hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1124-1127
- 6 丁进, 万荣, 叶静, 程时丹, 张曙, 吴云林. ^{13}C -美沙西丁呼气试验联合血清胰岛素样生长因子及其结合蛋白测定对肝硬化患者肝功能状况的评估. *胃肠病学和肝病学杂志* 2004;13:175-177
- 7 卢洪洲, 孙大裕, 严惟力, 许希海, 蒋义斌, 林祥通, 郭祥惠, 翁心华. ^{13}C 苯丙氨酸呼气试验评价肝功能研究初探. *世界感染杂志* 2003;3:390-391
- 8 Herold C, Heinz R, Radespiel-Troger M, Schneider HT, Schuppan D, Hahn EG. Quantitative testing of liver function in patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C to assess disease severity. *Liver* 2001;21:26-30
- 9 Suzuki S, Ishii Y, Asai S, Kohno T, Mazaki T, Takahashi Y, Iwai S, Ishikawa K. [^{1-13}C]Breath test of galactose and fructose for quantitative liver function. *J Surg Res* 2001;96:90-95

- 10 Rehwagen M, Krumbiegel P, Koschny I, Rolle-Kampczyk U, Richter M, Herbarth. The $[15N]$ methacetin liver function test characterizes multicomponent exposure of children in industrially polluted regions. *Isotopes Environ Health Stud* 2001;37:167-174
- 11 刘懿, 夏维新, 郑家驹. 第二届全国呼气试验临床应用与研究交流会纪要. 中华消化杂志 2003;23:105-106
- 12 唐恭顺, 匡安仁. ^{14}C -氨基比林呼气试验在肝脏疾病中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12:1184-1187
- 13 骆子义, 谌取鼎, 关丽娟, 何清, 杨山麦. 碳14-氨基比林呼气试验对肝硬化患者的肝储备功能及预后的评价. 中国中西医结合消化杂志 2003;9:277-279
- 14 Festi D, Capodicasa S, Vestito A, Mazzella G, Roda E, Vitacolonna E, Petrolati A, Angelico M, Colecchia A. Breath tests with stable isotopes: have they a role in liver transplantation? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004;8:55-58
- 15 Giannini E, Borro P, Botta F, Fumagalli A, Malfatti F, Podesta E, Romagnoli P, Testa E, Chiarbonello B, Polegato S, Mamone M, Testa R. Serum thrombopoietin levels are linked to liver function in untreated patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis. *J Hepatol* 2002;37:572-577
- 16 Zipprich A, Meiss F, Steudel N, Sziegoleit U, Fleig WE, Kleber G. ^{13}C -methacetin metabolism in patients with cirrhosis: relation to disease severity, haemoglobin content and oxygen supply. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1559-1562
- 17 Loreno M, Boccagni P, Rigotti P, Naccarato R, Burra P. Combined liver-kidney transplantation in a 15-year-old boy with α_1 -antitrypsin deficiency. *J Hepatol* 2002;36:565-568
- 18 Pfaffenbach B, Gotze O, Szymanski C, Hagemann D, Adamek RJ. The ^{13}C -methacetin breath test for quantitative noninvasive liver function analysis with an isotope-specific nondispersive infrared spectrometer in liver cirrhosis. *Dtsch Med Wochenschr* 1998;123:1467-1471
- 19 Zeng WB, Zhang WC, Xu SY, Yang ZZ, Liu C, Zhu DP, Wen QB, Shen QX, Wang XB. ^{13}C -methacetin breath test parameter S for liver diseases diagnosis. *Science China* 1996;39:87-98
- 20 Herold C, Gansmayer M, Ocker M, Zopf S, Gailer B, Hahn EG, Schuppan D. Inducibility of microsomal liver function may differentiate cirrhotic patients with maintained compared with severely compromised liver reserve. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:445-449
- 21 Ishii Y, Asai S, Kohno T, Ito A, Iwai S, Ishikawa K. Recovery of liver function in two-third partial hepatectomized rats evaluated by L-[1- ^{13}C] phenylalanine breath test. *Surgery* 2002;132:849-856
- 22 Giannini E, Fasoli A, Chiarbonello B, Malfatti F, Romagnoli P, Botta F, Testa E, Polegato S, Fumagalli A, Testa R. ^{13}C -aminopyrine breath test to evaluate of disease in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:717-725
- 23 严惟力, 孙大裕, 林祥通, 蒋义斌, 孙旭, 卢洪洲, 汪雁鹤, 刘兴党. L- ^{1-13}C -苯丙氨酸呼气试验在慢性肝病临床分期中的应用. 同位素 2003;16:240-244
- 24 Ciccocioppo R, Candelli M, Di Francesco D, Ciocca F, Taglieri G, Armuzzi A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Study of liver function in healthy elderly subjects using the ^{13}C -methacetin breath test. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:271-277
- 25 Pfaffenbach B, Gotze O, Szymanski CH, Hagemann D, Adamek J. ^{13}C -Methacetin-Atemtest zur quantitativen nicht-invasiven Leberfunktionsanalyse mittels eines isotopelektiven nicht-dispersiven infrarotspektrometers bei leberzirrhose. *Dtsch Med Wschr* 1998;123:1467-1471
- 26 Suzuki S, Ishii Y, Asai S, Kohno T, Mazaki T, Takahashi Y, Kohno T, Ishikawa K. 1-[1-(^{13}C)]Alanine is a useful substance for the evaluation of liver function. *J Surg Res* 2002;103:13-18
- 27 Herold C, Heinz R, Radespiel-Troger M, Schneider HT, Schuppan D, Hahn EG. Quantitative testing of liver function in patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C to assess disease severity. *Liver* 2001;21:26-30
- 28 于永征. 肝硬化肝储备功能的评价. 中国实用内科杂志 2002;22:653-654
- 29 陶其敏. 肝功能及肝病血清标志物. 陈敏章. 中华内科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1999:2179-2185

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003 年版): 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 地区分布数 26, 机构数 138, 国际论文比 0.03, 基金论文比 0.27. 2002 年度各学科影响因子较高的 3 种期刊排名: 世界华人消化杂志影响因子 1.926, 临床医学排名第 2 位. 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊排名: 世界华人消化杂志总被引频次 4151, 排名第 1 位. 世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004 年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊, 2001 年度第一届中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 从 2005 年开始, 世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊, 大 16 开, 160 页, 每月 1, 15 日出版, 50 元/期, 全年 24 期, 邮发代号 82-262, 北京报刊发行局发行. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

消化系统肿瘤术后应用生长激素联合低热量肠外营养的随机分组研究

刘权焰, 薛平惠, 刘志苏

刘权焰, 刘志苏, 武汉大学中南医院普外科 湖北省武汉市 430071
薛平惠, 湖北省武警总医院营养中心 湖北省武汉市 430074
刘权焰, 男, 1970-09-19 生, 湖北省大冶市人, 汉族, 1992 年湖北医科大学
本科毕业, 2000 年武汉大学医学院硕士研究生毕业, 2002 年武汉大学医学
院博士研究生, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的研究。
项目负责人: 刘志苏, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院普外科。
spss2005@126.com
电话: 027-67812963
收稿日期: 2004-04-30 接受日期: 2004-06-17

Impact of postoperative treatment with recombinant human growth hormone and hypocaloric parenteral nutrition on gastrointestinal cancer

Quan-Yan Liu, Ping-Hui Xue, Zhi-Su Liu

Quan-Yan Liu, Zhi-Su Liu, Department of General Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Ping-Hui Xue, Nutrition Center, the General Hospital of Chinese people's Armed Police Forces, Wuhan 430074, Hubei Province, China
Correspondence to: Zhi-Su Liu, Department of General Surgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China.
spss2005@126.com
Received: 2004-04-30 Accepted: 2004-06-17

Abstract

AIM: To investigate the role of recombinant human growth hormone (r-hGH) and hypocaloric parenteral nutrition (HPN) for postoperative patients with gastrointestinal cancer.

METHODS: A prospective, randomized and double-blinded clinical trial was performed. One hundred postoperative patients with gastrointestinal cancer were randomly divided into two groups: research group ($n = 50$) and control group ($n = 50$). Patients in research group were given HPN (6 d) plus r-hGH (7 d, sc) and patients in control group were treated with short-time standard TPN. The level of serum protein, immune function, nitrogen balance, infection related complications, hospital stay, survival rate and relapse rate were compared between the two groups.

RESULTS: The serum protein returned to pre-operative level in research group after 7 days, and the levels of IgG, IgA, IgM, CD₃ and CD₄ were not significantly different from those before operation. The serum protein returned to pre-operative level in control group after 10 days, and the levels of IgG, IgM, CD₃ and CD₄ significantly decreased (IgG: $P = 0.02 < 0.05$; IgM: $P = 0.04 < 0.05$; CD₃: $P = 0.02 < 0.05$; CD₄: $P = 0.03 < 0.05$). Concentrations of pre-albumin (Pr), transferrin (T) and fibronectin (F) after 10 days were significantly higher in research group than those in control

group (Pr: 0.25 ± 0.07 g/L vs 0.18 ± 0.06 g/L, $P < 0.01$; T: 2.41 ± 0.54 g/L vs 2.05 ± 0.61 g/L, $P < 0.05$; F: 2.72 ± 0.44 g/L vs 2.38 ± 0.89 g/L, $P < 0.05$). Nitrogen balance in research group was better than that in controls. Hospital stay was significantly shorter in research group than that in controls ($P = 0.03 < 0.05$). The 1-, 2- and 3-year survival rates and relapse rate were not significantly different between the two groups.

CONCLUSION: For patients with resectable gastrointestinal tumor, it is safe and beneficial to use short-term of r-hGH plus HPN after operation in order to accelerate recovery.

Liu QY, Xue PH, Liu ZS. Impact of postoperative treatment with recombinant human growth hormone and hypocaloric parenteral nutrition on gastrointestinal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2651-2654

摘要

目的: 根据证据医学的原理探讨消化系统肿瘤术后r-hGH联合低热量肠外营养的安全性、有效性及对预后的影响。

方法: 将消化系统肿瘤患者 100 例双盲、随机分为受试组和对照组, 受试组术后给予低热量肠外营养 6 d, 同时 sc 生长激素 7 d, 对照组接受传统 TPN 治疗 6 d; 对比观察术后两组患者血浆蛋白质水平、氮平衡、免疫功能状况、感染有关并发症、住院时间、术后生存率和复发率。

结果: 在进行 6 d 的肠外营养以后, 两组患者生命体征、血常规、肝肾功能、血脂和全身副反应均无显著性差异; 术后 7 d, 受试组蛋白质水平恢复至术前水平, IgG、IgA、IgM 和 CD₃、CD₄ 下降不明显 ($P > 0.05$); 对照组术后 10 d 蛋白质水平才恢复至术前水平, IgG、IgM、CD₃ 和 CD₄ 下降明显 (IgG: $P = 0.02 < 0.05$; IgM: $P = 0.04 < 0.05$; CD₃: $P = 0.02 < 0.05$; CD₄: $P = 0.03 < 0.05$); 术后 7 d、10 d, 对照组前清蛋白、转铁蛋白、纤维连接蛋白浓度、IgG、IgM、CD₃ 和 CD₄ 均显著低于受试组; 受试组氮平衡明显优于对照组, 术后住院时间显著低于对照组 ($P = 0.03 < 0.05$); 术后 1、2 和 3 a 生存率、复发率两组患者差异无显著性 ($P > 0.05$)。

结论: 对于能手术切除的消化系统肿瘤, 术后短期合理剂量使用生长激素联合低热量肠外营养, 是安全、有效的, 有利于患者术后的恢复。

刘权焰, 薛平惠, 刘志苏. 消化系统肿瘤术后应用生长激素联合低热量肠外营养的随机分组研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2651-2654
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2651.asp>

0 引言

消化道肿瘤术后早期,患者处于应激状态,其体内代谢紊乱,胰岛素抵抗导致营养素利用障碍,传统的营养支持不能有效地逆转其高分解代谢状态^[1-3].因此,许多学者试图通过代谢支持和调理来降低分解代谢,促进合成代谢,从而减轻损伤,提高组织修复能力,有利于机体康复.近年来,生长激素(r-hGH)在这一领域的作用受到越来越多的重视.研究表明,生长激素联合低热量肠外营养通过调控细胞因子作用,调整激素水平及代谢调理来截止肌肉和内脏蛋白的大量丢失,从而保护脏器功能^[4-8].但是,应用r-hGH特别是短期大剂量应用r-hGH是否会刺激、促进实体肿瘤的生长和复发,是目前国内外学者最为关注的问题^[9-11].据此,我们根据循证医学的原理探讨消化道肿瘤术后r-hGH联合低热量肠外营养的安全性、有效性及对预后的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2000-01/2000-12消化系肿瘤患者100例,其中肝癌21例,胆管癌4例,胰腺癌6例,胃癌35例,结肠癌20例,直肠癌14例.术前均有明确的诊断和手术指征,术后经病理学证实,且满足下列条件:无明显的心、肺、肝功能衰竭,无甲亢、糖尿病等代谢性疾病,无全身感染,免疫缺陷病,且无肿瘤远处转移.所有病例分为受试组和对照组,每组各50例,每例患者均知情同意.

1.2 方法

1.2.1 研究设计 本研究为随机双盲、有对照的临床研究.研究时间从2000-01/2003-12,采用由武汉大学医学院公共卫生学院提供的随机表,总表内容不让临床医师和患者知道.每一个入选患者准备营养液,该序号也出现在患者的处方和输液袋上.

1.2.2 营养配方 营养液均在超净TPN室配制.于术后1d开始给药,连续6d.受试组给予以下营养支持:每日热量62.9-83.9 kJ/kg,氮量为0.12-0.15 g/kg,热氮比为100-120:1,PN能源由25%葡萄糖和20%脂肪乳剂提供,糖脂能量比为6:4,氮源选择85 g/L的乐凡命(SSPC产品)和支链氨基酸溶液,适量补充维生素及电解质;在提供非蛋白热卡时,降低葡萄糖用量,增加脂肪乳剂供能,但以脂肪供能不超过总量的40%为宜.术后1d开始应用r-hGH(Saizen)8 IU/d,于08:00和20:00分2次皮下注射使用,连续用药7d.对照组接受传统TPN治疗,每日热量为105 kJ/kg,氮量为0.2-0.25 g/kg.

1.2.3 患者一般情况 两组患者的年龄、性别、手术前的体重及病因差异无显著性意义(表1).

1.2.4 安全性评价 两组患者均进行血常规,肝肾功能,血脂和血糖检查,并监测患者的生命体征和全身副作用.

1.2.5 替代有效性终点指标 (1)血浆蛋白质水平变化:两组患者分别于术前、术后7d、10d采静脉血测定血浆清蛋白、前清蛋白、转铁蛋白、纤维连接蛋白浓度.(2)氮平衡测定:手术后2d至手术后10d计算氮平衡.每天收集24h尿、粪、引流液,应用微量凯氏定氮法测定氮,按氮平衡=入氮量-(尿氮量+粪氮量+引流物氮量)公式计算.(3)免疫功能状况:于术后7d、10d,采用静脉血用贝克曼array特定蛋白分析仪测定IgG, IgA, IgM, 用免疫荧光法测定T细胞亚群.

1.2.6 临床预后终点指标 (1)感染有关并发症:感染性并发症是按照美国胸科医师协会/危重医学协调会(ACCP/SCCM)的定义和标准进行测定.(2)住院时间:按手术日到出院时间的天数计算.(3)术后生存率和复发率:从出院日开始计算,术后1a为3mo随访一次,2-3a为6mo随访1次.

统计学处理 数据以均值±标准差(mean±SD)表示.采用SPSS 10.0软件,用方差分析比较两组间计量资料,计数资料采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 安全性指标结果 在进行6d的肠外营养以后,两组患者生命体征、血常规、肝肾功能、血脂和全身副反应均无显著性差异.

2.2 血浆蛋白质和氮平衡 两组患者术前蛋白质水平差别无显著意义($P>0.05$).术后7d,受试组蛋白质水平恢复至术前水平,而对照组术后10d才恢复至术前水平.两组间比较,术后7d、10d,对照组前清蛋白、转铁蛋白、纤维连接蛋白浓度均显著低于受试组($P<0.05$,表2).受试组氮平衡明显优于对照组,两组间存在显著差异($P<0.05$,图1).

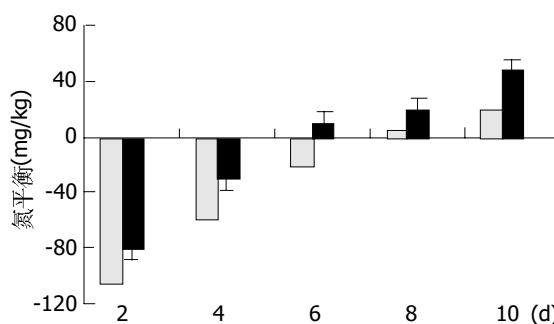


图1 消化系肿瘤患者氮平衡变化.

表1 消化系肿瘤患者术前的临床情况

分组	n	年龄/a	男	女	体重/Kg	肝癌	胆管癌	胰腺癌	结肠癌	直肠癌	胃癌
受试组	50	50.4 ± 10.2	28	22	54.7 ± 10.8	12	1	4	11	6	16
对照组	50	51.5 ± 11.8	30	20	53.5 ± 9.7	9	3	2	9	8	19

表2 消化系肿瘤患者蛋白质水平变化(mean ± SD)

	分组	白蛋白(g/L)	前清蛋白(g/L)	转铁蛋白(g/L)	纤维连接蛋白(g/L)
术前	受试组	36.7 ± 3.8	0.20 ± 0.05	2.32 ± 0.56	2.54 ± 0.67
	对照组	37.4 ± 4.4	0.21 ± 0.06	2.28 ± 0.72	2.47 ± 0.78
术后 7 d	受试组	35.1 ± 3.6	0.19 ± 0.09 ^d	2.09 ± 0.48 ^e	2.46 ± 0.85 ^e
	对照组	34.2 ± 4.4	0.14 ± 0.03 ^b	1.75 ± 0.63 ^a	1.94 ± 0.58 ^a
术后 10 d	受试组	37.5 ± 4.1	0.25 ± 0.07 ^d	2.41 ± 0.54 ^e	2.72 ± 0.44 ^e
	对照组	35.7 ± 3.5	0.18 ± 0.06	2.05 ± 0.61	2.38 ± 0.89

^a $P < 0.05$ vs 术前; ^b $P < 0.01$ vs 术前; ^c $P < 0.05$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 对照组。

表3 消化系肿瘤患者免疫功能的变化(mean ± SD)

	分组	IgG(g/L)	IgM(g/L)	IgA (g/L)	CD ₃ %	CD ₄ %	CD ₈ %
术前	受试组	14.24 ± 4.05	3.72 ± 1.42	2.18 ± 1.01	56.45 ± 5.71	39.8 ± 3.75	26.14 ± 2.48
	对照组	13.96 ± 5.18	3.58 ± 1.76	2.28 ± 1.24	54.83 ± 6.41	40.75 ± 4.2	25.03 ± 3.17
术后 7d	受试组	13.48 ± 3.01 ^d	3.64 ± 1.85 ^d	2.07 ± 2.14	53.15 ± 4.32 ^e	37.29 ± 4.15 ^d	23.37 ± 4.11
	对照组	9.74 ± 4.92 ^b	2.89 ± 3.16 ^b	1.95 ± 3.22	42.29 ± 4.78 ^a	30.28 ± 5.17 ^b	27.58 ± 3.52
术后 10d	受试组	18.66 ± 5.21 ^d	4.21 ± 2.31 ^d	2.26 ± 3.45	58.42 ± 5.94 ^d	42.12 ± 6.29 ^d	20.15 ± 4.93 ^d
	对照组	10.19 ± 3.74 ^a	2.92 ± 2.01 ^a	2.14 ± 2.73	45.25 ± 7.12 ^a	33.92 ± 5.24 ^b	29.74 ± 6.12

^a $P < 0.05$ vs 术前; ^b $P < 0.01$ vs 术前; ^c $P < 0.05$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 对照组。

表4 消化系肿瘤患者术后生存率和复发率 %(n/n)

分组	生存率			复发率		
	1 a	2 a	3 a	1 a	2 a	3 a
受试组	82 (41/50)	64 (32/50)	42 (21/50)	30 (15/50)	42 (21/50)	61 (31/50)
对照组	80 (40/50)	66 (33/50)	38 (19/50)	28 (14/50)	48 (24/50)	66 (33/50)

2.3 免疫功能和临床感染有关的并发症 与术前相比较, 对照组血清 IgG, IgM, CD₃ 和 CD₄ 水平在术后 7 d 显著下降, 在术后 10 d 仍无明显恢复; 受试组在术后 7 d, IgG、IgA、IgM 和 CD₃、CD₄ 下降不明显($P > 0.05$)。两组间比较, 术后 7 d、10 d, 对照组 IgG、IgM、CD₃ 和 CD₄ 均显著低于受试组, 而 CD₈ 则高于受试组(表 3)。所有患者均未发生切口感染, 但对对照组 1 例直肠癌发生吻合漏, 1 例胰头癌发生肺部感染。

2.4 住院时间和术后生存率和复发率 受试组患者术后住院时间为(12.8 ± 3.4 d), 显著低于对照组(16.9 ± 6.4 d) ($P = 0.03 < 0.05$)。术后 1、2 和 3 a 生存率两组患者差异无显著性, 1、2 和 3 a 复发率, 两组差异亦无显著性(表 4)。

3 讨论

由于恶性肿瘤对氮的需求, 消化道肿瘤患者术前存在不同程度的营养不良。手术创伤后应激期蛋白分解代谢必然会进一步加剧蛋白质的分解。然而, 传统的肠外营养虽提供了充足的热量和底物, 却不能有效地逆转其高分解代谢状态, 促进蛋白质合成^[12]。为追求正氮平衡而带来的高氮量、高热量输注往往适得其反, 反而会增加患者的代谢负担, 引起更多的代谢紊乱^[13]。为

了达到既能改善患者的营养状况, 又不致于加重患者的代谢负担, 许多学者希望通过生长激素的代谢调节和代谢支持来改善肿瘤患者异常代谢状态, 促进蛋白质合成, 纠正负氮平衡, 提高机体的免疫防御功能^[14-17]。生长激素主要促进葡萄糖氧化, 从而提高能量水平, 促进脂肪分解及糖异生, 在转录与翻译水平上促进蛋白质合成^[18-20]。研究表明: 单纯低热量肠外营养一般不能使机体达到正氮平衡, 但同时使用生长激素, 则能明显改善氮平衡^[13, 21]。我们的研究结果显示, 生长激素有明显的储氮效应, 受试组前清蛋白、转铁蛋白、纤维连接蛋白浓度在术后 7 d, 恢复至术前水平, 在术后 10 d, 明显高于术前水平; 而对照组直至术后 10 d 才恢复至术前水平; 且在术后 7 d、10 d, 上述蛋白浓度, 受试组显著高于对照组; 氮平衡测定结果亦显示, 受试组氮平衡显著优于对照组, 表明受试组外源性氮得到较好的利用。

消化系肿瘤患者普遍存在免疫功能低下, 机体处于低应答或不应答状态, T 淋巴细胞亚群的数量及功能发生异常时, 将直接影响肿瘤的发生、发展及预后。众多研究表明, 生长激素可刺激机体产生 IgG、IgM、IgA, 改善体液免疫功能, 对 T、B 淋巴细胞, K 细胞及巨

噬细胞均有调节作用^[14,22-23]。我们的研究显示消化道肿瘤术后7 d, 对照组血清 IgG, IgM 和 CD3, CD4 水平显著下降, 术后 10 d 仍无明显恢复; 受试组 IgG, IgA, IgM 和 CD3, CD4 下降不明显, 且在术后 10 d 较术前有明显升高; 表明生长激素联合低热量肠外营养能改善宿主的细胞免疫和体液免疫功能, 其机制可能与宿主营养状况的改善有关。术后感染并发症、住院时间, 受试组均显著低于对照组, 进一步表明, 生长激素联合低热量肠外营养可作为消化道肿瘤术后患者较为合理的营养支持。

近来, 应用生长激素, 特别是短期大剂量应用生长激素是否会刺激、促进实体肿瘤的生长和复发, 是目前最为关注问题。有研究报道, 生长激素对机体代谢, 尤其是蛋白质代谢的作用主要是通过 IGF-1 受体介导实现的, 绝大多数消化道肿瘤细胞表面有 IGF-1 受体^[24], 因此, 消化道肿瘤术后使用生长激素具有潜在的促肿瘤生长作用^[10,24]。但是, 生长激素对机体的作用是多方面的, 肿瘤在体内的发生、发展和转移是多步骤、复杂的。目前, 临床上还没有证据表明, 生长激素具有刺激肿瘤生长的作用^[25-26]; 相反大量临床结果显示, 围手术期使用外源性生长激素是安全的, 他可以保存宿主自体成分, 不会刺激肿瘤生长, 并能降低围手术期并发症的发生率和死亡率。

我们采用证据医学原理, 系随机、双盲、对照、前瞻性研究, 其结果证实消化道肿瘤术后, 生长激素联合低热量肠外营养明显改善了术后营养状况和免疫功能, 降低了感染并发症。术后生存时间随访结果表明, 外源性生长激素应用与否, 对消化道肿瘤术后宿主生存率和肿瘤复发率没有明显的影响。

4 参考文献

- Bozzetti F, Gavazzi C, Ferrari P, Dworzak F. Effect of total parenteral nutrition on the protein kinetics of patients with cancer cachexia. *Tumori* 2000;86:408-411
- Nygren J, Thorell A, Brismar K, Essen P, Wernerman J, McNurlan MA, Garlick PJ, Ljungqvist O. Glucose flux is normalized by compensatory hyperinsulinaemia in growth hormone-induced insulin resistance in healthy subjects, while skeletal muscle protein synthesis remains unchanged. *Clin Sci (Lond)* 2002;102:457-464
- Bozzetti F, Gavazzi C, Cozzaglio L, Costa A, Spinelli P. Total parenteral nutrition and tumor growth in malnourished patients with gastric cancer. *Tumori* 1999;85:163-166
- Wolf RF, Pearlstone DB, Newman E, Heslin MJ, Gonen A, Burt ME, Brennan MF. Growth hormone and insulin reverse net whole body and skeletal muscle protein catabolism in cancer patients. *Ann Surg* 1992;216:280-288
- Wong WK, Soo KC, Nambiar R, Tan YS, Yo SL, Tan IK. The effect of recombinant growth hormone on nitrogen balance in malnourished patients after major abdominal surgery. *Aust N Z J Surg* 1995;65:109-113
- Vara-Thorbeck R, Ruiz-Requena E, Guerrero-Fernandez JA. Effects of human growth hormone on the catabolic state after surgical trauma. *Horm Res* 1996;45:55-60
- Hammarqvist F, Sandgren A, Andersson K, Essen P, McNurlan MA, Garlick PJ, Wernerman J. Growth hormone together with glutamine-containing total parenteral nutrition maintains muscle glutamine levels and results in a less negative nitrogen balance after surgical trauma. *Surgery* 2001;129:576-586
- Carroll PV, Jackson NC, Russell-Jones DL, Treacher DF, Sonksen PH, Umpleby AM. Combined growth hormone/insulin-like growth factor I in addition to glutamine-supplemented TPN results in net protein anabolism in critical illness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E151-157
- Ruokonen E, Takala J. Dangers of growth hormone therapy in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:199-209
- Revhag A, Mjaaland M. Growth hormone and surgery. *Horm Res* 1993;40:99-101
- Bartlett DL, Charland S, Torosian MH. Growth hormone, insulin, and somatostatin therapy of cancer cachexia. *Cancer* 1994;73:1499-1504
- Irgau I, Fulda GJ. Effects of growth hormone on nitrogen balance in the hypermetabolic state: a selected review of the literature. *Del Med J* 1993;65:767-772
- Manson JM, Smith RJ, Wilmore DW. Growth hormone stimulates protein synthesis during hypocaloric parenteral nutrition. Role of hormonal-substrate environment. *Ann Surg* 1988;208:136-142
- Vara-Thorbeck R, Guerrero JA, Rosell J, Ruiz-Requena E, Capitan JM. Exogenous growth hormone: effects on the catabolic response to surgically produced acute stress and on post-operative immune function. *World J Surg* 1993;17:530-537
- Bjarnason R, Wickelgren R, Hermansson M, Hammarqvist F, Carlsson B, Carlsson LM. Growth hormone treatment prevents the decrease in insulin-like growth factor I gene expression in patients undergoing abdominal surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1566-1572
- Bozzetti F, Gavazzi C, Miceli R, Rossi N, Mariani L, Cozzaglio L, Bonfanti G, Piacenza S. Perioperative total parenteral nutrition in malnourished, gastrointestinal cancer patients: a randomized, clinical trial. *J Parenter Enteral Nutr* 2000;24:7-14
- Jackson NC, Carroll PV, Russell-Jones DL, Sonksen PH, Treacher DF, Umpleby AM. Effects of glutamine supplementation, GH, and IGF-I on glutamine metabolism in critically ill patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E226-233
- Zhang X, Li J, Li N. Growth hormone improves graft mucosal structure and recipient protein metabolism in rat small bowel transplantation. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:732-735
- Kolstad O, Jenssen TG, Ingebretsen OC, Vinnars E, Revhaug A. Combination of recombinant human growth hormone and glutamine-enriched total parenteral nutrition to surgical patients: effects on circulating amino acids. *Clin Nutr* 2001;20:503-510
- Leary MJ, Koll M, Ferguson CN, Coakley JH, Hinds CJ, Preedy VR, Garlick PJ. Liver albumin synthesis in sepsis in the rat: influence of parenteral nutrition, glutamine and growth hormone. *Clin Sci (Lond)* 2003;105:691-698
- Carli F, Webster JD, Halliday D. A nitrogen-free hypocaloric diet and recombinant human growth hormone stimulate post-operative protein synthesis: fasted and fed leucine kinetics in the surgical patient. *Metabolism* 1997;46:796-800
- Liu W, Jiang Z, Wang X, Shu H, Cui W, Wilmore DW. Impact of perioperative treatment of recombinant human growth hormone on cell immune function and intestinal barrier function: randomized, double-blind, controlled trial. *World J Surg* 2003;27:412-415
- Shim M, Cohen P. IGFs and human cancer: implications regarding the risk of growth hormone therapy. *Horm Res* 1999;51(Suppl 3):42-51
- Mercadante S. Parenteral versus enteral nutrition in cancer patients: indications and practice. *Support Care Cancer* 1998;6:85-93
- Berman RS, Harrison LE, Pearlstone DB, Burt M, Brennan MF. Growth hormone, alone and in combination with insulin, increases whole body and skeletal muscle protein kinetics in cancer patients after surgery. *Ann Surg* 1999;229:1-10
- Ogilvy-Stuart AL. Safety of growth hormone after treatment of a childhood malignancy. *Horm Res* 1995;44(Suppl 3):73-79

门奇静脉断流术对胆囊运动功能的影响

金红旭, 吴硕东, 张雪峰, 陈宪英, 张国旭

金红旭, 张雪峰, 中国人民解放军沈阳军区总医院普通外科
辽宁省沈阳市 110016

吴硕东, 中国医科大学附属二院普外二科 辽宁省沈阳市 110003

陈宪英, 张国旭, 中国人民解放军沈阳军区总医院核医学科
辽宁省沈阳市 110016

金红旭, 男, 1971-12-31 生, 辽宁省开原市人, 朝鲜族. 2004 年中国医科大学博士, 主治医师. 主要从事胆道动力学研究.

项目负责人: 金红旭, 110016, 辽宁省沈阳市沈河区文化路 83 号, 中国人民解放军沈阳军区总医院普通外科. hongxujin@tom.com
电话: 024-23051261

收稿日期: 2004-07-30 接受日期: 2004-08-30

Effect of portal azygous disconnection on gallbladder motor function

Hong-Xu Jin, Shuo-Dong Wu, Xue-Feng Zhang, Xian-Ying Chen, Guo-Xu Zhang

Hong-Xu Jin, Xue-Feng Zhang, Department of General Surgery, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Shuo-Dong Wu, Second Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Xian-Ying Chen, Guo-Xu Zhang, Department of Nuclear Medicine, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Hong-Xu Jin, Department of General Surgery, General Hospital of Shenyang Military Command, 83 Wenhua Street, Shenhe District, Shenyang 110016, Liaoning Province, China. hongxujin@tom.com

Received: 2004-07-30 Accepted: 2004-08-30

Abstract

AIM: To investigate and clarify the effect of vagus on gallbladder motility through a comparative study.

METHODS: Twenty-three hepatocirrhosis patients with portal hypertension were included in this study. In Hassab operation group, the anterior and posterior trunk of vagus were surgically excised ($H, n = 18$); In vena coronaria ventriculi embolization group, the vena coronaria ventriculi bole was ligated and injected TH adhesive (8 mL) after splenectomy (VCE, $n = 5$). Before operation and 10 d after operation, ^{99m}Tc -labeled diethyl acetyl acid anilide iminodiacetic acid (^{99m}Tc -EHIDA, 185 MBq) was administered intravenously to the patients, and then scintigraphic method was used to assess the motor function of gallbladder. The index including radiocounting 30 min after injected ^{99m}Tc -EHIDA (GBRC 30min), emptying fraction (GBEF), emptying period (GBEP), emptying rate (GBER), latent period (GBLP), latent period radiocounting increment (GBLI) and latent period radiocounting increment rate (GBLR) were analyzed.

RESULTS: GBRC 30 min in H group was significantly lower after operation than that before operation (74.8 ± 66.9 vs

$155.7 \pm 72.9, P < 0.05$); GBLP was very short in pre-operation, and GBLP prolonged significantly after operation (13.36 ± 5.92 vs $2.24 \pm 1.48, P < 0.01$); the gallbladder radiocounting increased gradually during GBLP; the GBLI and GBLP level were very low before operation, but the GBLI and GBLP increased significantly after operation (79.5 ± 56.3 vs $9.2 \pm 11.7, 113.4 \pm 49.5$ vs $7.6 \pm 10.8, P < 0.01$); GBEP shortened significantly after operation (18.5 ± 6.3 vs $24.1 \pm 6.4, P < 0.05$); GBEF and GBER decreased obviously after operation (13.1 ± 5.4 vs $32.3 \pm 16.3, 0.7 \pm 0.3$ vs $1.4 \pm 0.8, P < 0.01$). The preceding parameters in VCE group had no significant difference before and after operation ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The gallbladder tension weakens obviously in interdigestive phase after the vagus is excised; the gallbladder contraction delays, and the motor function weakens obviously after meals.

Jin HX, Wu SD, Zhang XF, Chen XY, Zhang GX. Effect of portal azygous disconnection on gallbladder motor function. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11):2655-2659

摘要

目的: 利用脾切除、贲门周围血管离断术, 即 Hassab 手术时切断迷走神经, 脾切除、胃冠状静脉栓塞术时保留迷走神经这一特点, 应用放射性核素动态显像的方法, 对比研究两种术式术前术后胆囊运动功能, 为进一步阐明迷走神经在胆囊运动中的作用提供有力依据.

方法: 明确诊断肝硬化门静脉高压症患者 23 例, 其中 Hassab 手术组 18 例, 术中切断迷走神经前后干; 栓塞术组 5 例, 行脾切除后结扎胃冠状静脉并穿刺注射 TH 胶. 全组患者均在术前及术后第 10 d 空腹静脉注射 ^{99m}Tc -EHIDA (二乙基乙酰替苯胺亚氨二醋酸) 动态显像, 0.25 分/帧. 连续 30 min 后食标准脂餐, 再连续动态显像 60 min. 画出胆囊感兴趣区 (ROI), 建立时间放射性曲线, 分析注射 ^{99m}Tc -EHIDA 30 min 后胆囊的放射性计数 (GBRC 30 min)、排胆分数 (GBEF)、排胆期 (GBEP)、排胆率 (GBER)、潜伏期 (GBLP)、潜伏期放射性计数的增量 (GBLI)、潜伏期放射性计数的增加率 (GBLR) 等指标.

结果: Hassab 手术组术后 GBRC 30 min 较术前明显减少 (74.8 ± 66.9 vs $155.7 \pm 72.9, P < 0.05$); 术前的 GBLP 很短, 术后的 GBLP 却明显延长 (13.36 ± 5.92 vs $2.24 \pm 1.48, P < 0.01$). 在 GBLP 内胆囊的放射性计数逐渐增加, 但术前的 GBLI 及 GBLR 很小, 而术后的 GBLI 及 GBLR 明显增加 (79.5 ± 56.3 vs $9.2 \pm 11.7, 113.4 \pm 49.5$ vs 7.6 ± 10.8 ,

$P<0.01$); 术后 GBEP 明显缩短(18.5 ± 6.3 vs 24.1 ± 6.4 , $P<0.05$), GBEF 和 GBER 明显降低(13.1 ± 5.4 vs 32.3 ± 16.3 , 0.7 ± 0.3 vs 1.4 ± 0.8 , $P<0.01$). 栓塞术组各指标术前术后均无显著差异.

结论: 切断迷走神经后消化间期胆囊的张力明显减低, 餐后的胆囊收缩延迟、运动功能明显减弱.

金红旭, 吴硕东, 张雪峰, 陈宪英, 张国旭. 门奇静脉断流术对胆囊运动功能的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2655-2659

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2655.asp>

0 引言

胆囊结石的形成是多种因素共同参与的结果^[1-4], 胆囊运动功能异常无疑是其中一个很重要的因素^[5-8]. 胆囊运动功能受神经和体液等因素的调节^[9-10], 迷走神经是调节胆囊运动最重要的因素^[11-13]. 但由于干扰因素很多且难以控制, 临床研究较少. 目前认为门奇静脉断流术是治疗肝硬化门静脉高压症患者食管胃底静脉曲张破裂出血的有效方法并被广泛应用^[14-15]. 脾切除、贲门周围血管离断术, 即 Hassab 手术是应用较广泛的断流术. 该手术行脾切除后要离断贲门周围血管, 游离食管下段时为达到更彻底的断流效果需切断迷走神经前后干^[16-18]. 脾切除、胃冠状静脉栓塞术是行脾切除后在胃冠状静脉起始部注射医用 α - 氰基丙烯酸脂单体(简称 TH 胶), 栓塞贲门周围所有血管达到断流的目的^[19-22]. 由于该术式不解剖贲门周围组织, 迷走神经得以保留. 我们利用两种不同的术式特点, 应用放射性核素动态显像的方法, 对比研究术前术后胆囊运动功能的变化, 为进一步阐明人迷走神经在胆囊运动中的作用提供有力依据.

1 材料和方法

1.1 材料 肝硬化门静脉高压症患者 23 例, 男 13 例, 女 10 例, 平均年龄 51 岁. 有不同程度的脾大、脾功能亢进, 经胃镜检查发现有食管胃底静脉曲张, 经 B 超检查确认均无胆道疾病. 肝功能 Child 分级均为 A 级. Hassab 手术 18 例(男 10 例, 女 8 例), 平均年龄 50 岁, 行 Hassab 手术. 方法为行脾切除后离断及结扎上自贲门上 6 cm, 下至胃大小弯上 1/2 的周围动静脉, 游离食管下段时切断迷走神经前后干. 栓塞术 5 例(男 3 例, 女 2 例), 平均年龄 53 岁, 行脾切除、胃冠状静脉栓塞术. 方法为行脾切除后解剖胃冠状静脉主干, 近根部结扎, 在结扎线的头侧穿刺注射 TH 胶 8 mL. 全组患者术后 48-96 h 排气、进流食, 1 wk 以内排便、进半流食, 术后 10 d 内肝功能均恢复到 Child 分级 A 级.

1.2 方法 全组患者均在术前 3 d 及术后 10 d 空腹 ^{99m}Tc -EHIDA(二乙基乙酰替苯胺亚氨二醋酸) 185 MBq, iv, 0.25 分/帧动态显像. 连续 30 min 后食标准脂餐(Ensure 250 mL 标准冲调液, 含 Ensure 粉 50 g, 热量 1046.0 kJ, 蛋白 14.0%, 脂肪 31.5%, 碳水化合物 54.5%), 再

连续动态显像 60 min. 画出胆囊感兴趣区(ROI), 建立感兴趣区的时间放射性曲线(如图 1AB, 3AB), 并采用以下 7 个指标对曲线进行对比分析: (1)注射 ^{99m}Tc -EHIDA 30 min 后胆囊的放射性(GBRC30 min). (2)排胆分数(GBEF, %): (脂餐后胆囊开始收缩前的最高放射性 - 胆囊收缩至最小放射性)/收缩前最高放射性 $\times 100\%$. (3)排胆期(GBEP, min): 胆囊开始收缩至不再收缩的时间. (4)排胆率(GBER, %/min): GBEF/GBEP. (5)潜伏期(GBLP, min): 脂餐开始到胆囊开始收缩的时间. (6)潜伏期放射性增量(GBLI): 潜伏期结束时放射性 - 潜伏期开始时放射性. (7)潜伏期放射性增加率(GBLR, %): GBLI/GBRC30 min $\times 100$.

统计学处理 各指标术前术后差值经正态性检验, 均符合正态分布($P>0.05$). 进行术前术后的配对 t 检验. 全部统计分析用 SPSS11.0 软件完成, 结果用均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示.

2 结果

血中 ^{99m}Tc -EHIDA 迅速被肝细胞摄取, 排泄到胆道, 并进入胆囊储存和浓缩. 注射 ^{99m}Tc -EHIDA 30 min 后, 脂餐前的胆囊的放射性计数能够反映在消化间期同一时间内胆汁流入胆囊的量. 本实验结果显示 Hassab 手术组术后 GBRC30 min 较术前明显减少(74.8 ± 66.9 vs 155.7 ± 72.9 , $P<0.05$). 栓塞术组术前术后无明显差异($P>0.05$). 进脂餐可以引起胆囊收缩, 但都有一定的潜伏期. 本研究显示 Hassab 手术组术前的 GBLP 很短, 术后的 GBLP 却明显延长(min; 13.4 ± 5.9 vs 2.2 ± 1.5 , $P<0.01$). 在潜伏期内胆囊的放射性计数逐渐增加, 但术前的 GBLI 及 GBLR 很小, 而术后的 GBLI 及 GBLR 明显增加(79.5 ± 56.3 vs 9.2 ± 11.7 , 113.4 ± 49.5 vs 7.6 ± 10.8 , $P<0.01$). 栓塞术组术前术后 GBLP、GBLI、GBLR 均无显著差异($P>0.05$). 胆囊的 GBEP、GBEF 及 GBER 是反映餐后胆囊运动功能的重要指标. 本研究发现 Hassab 手术组术后 EP 明显缩短(min; 18.5 ± 6.3 vs 24.1 ± 6.4 , $P<0.05$), GBEF 和 GBER 明显降低(%; 13.1 ± 5.4 vs 32.3 ± 16.3 , %/min; 0.7 ± 0.3 vs 1.4 ± 0.8 , $P<0.01$). 栓塞术组术前术后 GBEP, GBEF, GBER 均无显著差异($P>0.05$)(表 1, 图 1-3).

3 讨论

关于迷走神经在胆囊运动中的作用研究很多^[11-13], 但大多限于动物实验, 临床上尚无法很好地证实其结果. 一些学者通过研究胃切除术后患者的胆囊运动功能, 推测人迷走神经在胆囊运动功能的调节中起着重要作用^[24-26]. 但此法不能排除胃切除及消化道重建等因素的干扰. 1960 年代 Hassab *et al*^[16]首次行脾切除、贲门周围血管离断术以来, Hassab 手术被广泛应用于治疗门静脉高压的食管胃底静脉曲张. 此后虽然出现很多改良的、联合的手术, 但 Hassab 手术仍作为断流术的基

表 1 Hassab 手术和脾切除、胃冠状静脉栓塞术前胆囊收缩功能比较

指标	Hassab 手术		脾切除、胃冠状静脉栓塞术	
	术前	术后	术前	术后
GBRC 30 min (Bq)	155.7 ± 72.9	74.8 ± 66.9 ^a	124.4 ± 35.3	141.4 ± 63.5
GBLP(min)	2.2 ± 1.5	13.4 ± 5.9 ^b	2.4 ± 1.0	2.4 ± 1.5
GBLI(Bq)	9.2 ± 11.7	79.5 ± 56.3 ^b	8.2 ± 4.6	8.6 ± 4.9
GBLR(%)	7.6 ± 10.8	113.4 ± 49.5 ^b	5.4 ± 4.0	5.5 ± 1.5
GBEP(min)	24.1 ± 6.4	18.5 ± 6.3 ^a	25.9 ± 4.7	23.5 ± 6.4
GBEF(%)	32.3 ± 16.3	13.1 ± 5.4 ^a	39.8 ± 17.0	41.2 ± 28.7
GBER(%/min)	1.4 ± 0.8	0.7 ± 0.3 ^a	1.5 ± 0.7	2.2 ± 2.4

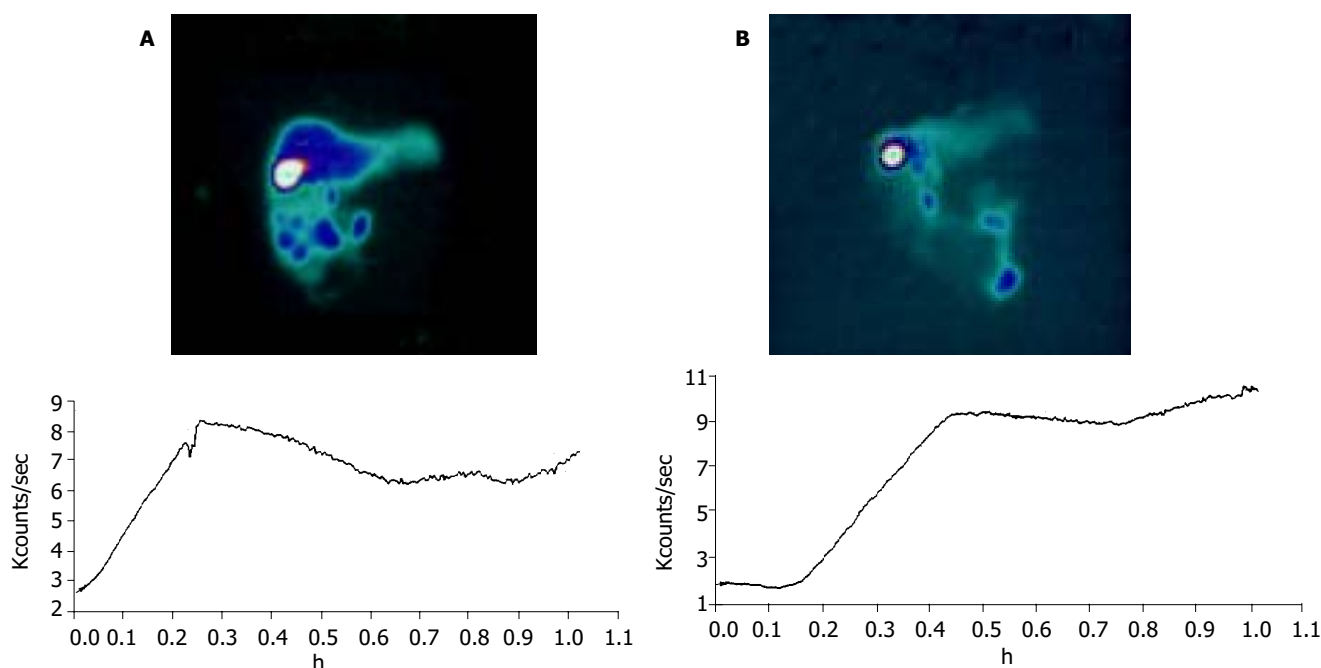
^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 术前.

图 1 Hassab 手术对胆囊时间放射性曲线的影响. A:手术前; B:手术后.

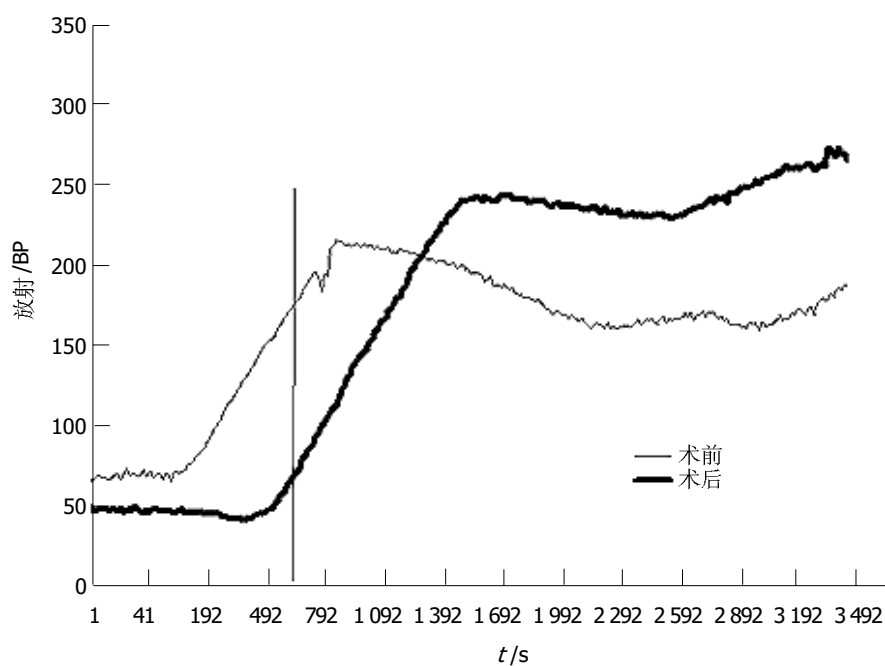


图 2 Hassab 手术对胆囊时间放射性的影响.

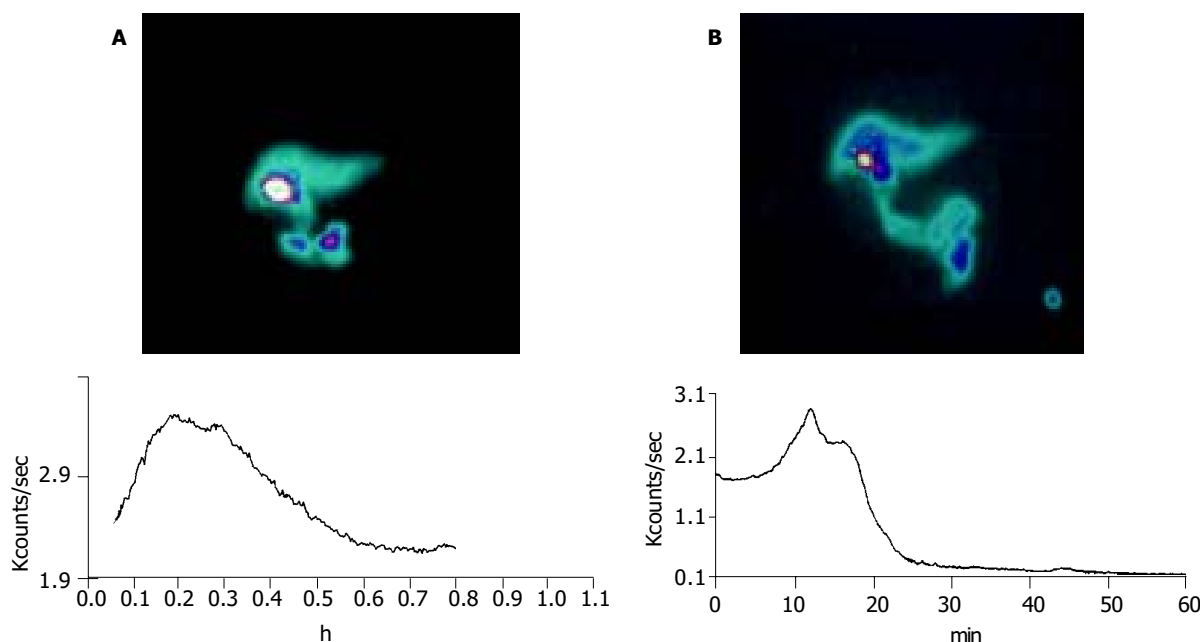


图3 栓塞术前胆囊的时间放射性曲线. A: 栓塞术前; B: 栓塞术后.

本术式被广泛应用^[14-15, 17-18]. 该手术行脾切除后要离断贲门周围血管, 游离食管下段时为达到更彻底的断流效果需切断迷走神经前后干. 脾切除、胃冠状静脉栓塞术是行脾切除后用栓塞法代替了传统的断流方法, 注入TH胶后10-15 s内就在胃冠状静脉主干、各分支、食管下端静脉丛及胃底静脉丛内形成连续的血管铸型, 从而阻断了胃食管壁内、外的反常血流, 基本上达到简单又能完全断流的目的^[19-21]. 由于该术式不解剖贲门周围组织, 迷走神经得以保留. 两种断流术都保留了消化道的完整性, 而对迷走神经的处理完全不同. 所以通过对比两种手术后各项指标的变化研究人迷走神经的功能不失为一种较好的临床研究模型. 虽然患者的肝病基础可能对研究产生一定的干扰, 但可以采取将每位患者的肝功能调整到Child A级、对同一患者进行术前术后的自身对照研究等方法尽可能将干扰降低到最小. 放射性核素^{99m}Tc-EHIDA能特异性地被肝细胞摄取, 并很快随胆汁排泄, 经胆道系统、肠道排出体外. 进行动态显像能动态反映胆汁流动的全过程, 图像清晰, 分辨率高, 是形态和功能相结合的显像, 准确性较高, 患者辐射剂量很低, 是研究胆囊及胆道运动功能的较好方法^[27-29].

动物实验表明, 在消化间期迷走神经是维持胆囊张力的重要因素^[12-13, 23, 30]. 多数学者认为, 虽然在消化间期胆囊呈松弛状态, 但也不是简单地、被动地持续充盈和舒张, 也呈现节律性收缩和舒张^[12-13], 不断使肝脏分泌的稀薄胆汁与胆囊内的浓缩胆汁进行交换^[31-34]. 这种胆汁交换受胆囊张力和胆道压力的影响. 因为张力减低会影响胆囊原有胆汁的排出, 胆道压力减低会影响肝脏分泌的稀薄胆汁进入胆囊. 我们在注射^{99m}Tc-EHIDA之前受试者已经禁食一夜, 胆囊内存有大量不含核素的胆汁, 而注射^{99m}Tc-EHIDA后胆囊逐渐显

影, 说明肝脏分泌的含有核素的胆汁不断与胆囊胆汁进行交换. 有研究发现完全切断两侧迷走神经胆囊容积可增大一倍^[11], 说明切断迷走神经后胆囊张力减低是影响胆汁交换主要因素. 我们发现在切断迷走神经后的空腹状态下, 注射^{99m}Tc-EHIDA 30 min后胆囊的放射性计数明显减少. 我们认为这不是胆囊容积减少, 而是说明切断迷走神经使消化间期的胆囊张力减低, 造成同一时间内胆汁流入胆囊的量明显减少.

Xynos *et al*^[35]研究发现, 患有胆囊结石的患者脂餐后胆囊不是马上收缩, 而是有较长的潜伏期. 我们也发现切断迷走神经后患者脂餐后胆囊收缩的潜伏期明显延长(min; 14.2 ± 5.0 vs 2.4 ± 1.4 , $P < 0.01$). 由于切断迷走神经后迷走神经的头期兴奋不能传到胆囊, 只有食物到达胃窦部及十二指肠上段后才能通过各种途径使胆囊收缩, 因此切断迷走神经可造成脂餐后胆囊收缩延迟. 胆囊及Oddi括约肌的运动主要受迷走神经的调节^[12-13], 而肝脏分泌胆汁的过程主要受体液因素的调节, 迷走神经对肝脏分泌胆汁的作用不大^[36-39]. 切断迷走神经使脂餐后胆囊及Oddi括约肌的运动延迟, 而脂餐可能通过某些体液途径使肝脏的胆汁分泌增加. 使胆道的压力一过性升高. 本研究结果显示, 在潜伏期胆囊的放射性计数明显增加($GBLI\ 2\ 906.1 \pm 1\ 956.8$, $GBLR\ 116.0 \pm 41.9\%$), 与文献^[40]报道结果相似. 我们认为其主要原因是胆道压力升高, 使含核素较多的胆汁进入胆囊的速度加快造成的. 具体机制尚有待于进一步研究. 胆囊的GBEP反映脂餐后胆囊持续收缩的时间、GBEF反映餐后胆囊持续收缩排出胆汁的百分比、GBER反映单位时间内排出胆汁的百分比, 是反映胆囊收缩力的重要指标. 本研究发现切断迷走神经后餐后胆囊的GBEP明显缩短($P < 0.05$), GBEF和GBER明显降低($P < 0.01$), 说明餐后胆囊的运动功能明显减弱.

与动物实验结果基本一至, 说明人迷走神经在餐后胆囊运动过程中起重要的调节作用, 切断迷走神经会使餐后胆囊运动功能明显减弱。

4 参考文献

- Gustafsson U, Sahlin S, Einarsson C. High level of deoxycholic acid in human bile does not promote cholesterol gallstone formation. *World J Gastroenterol* 2003;9:1576-1579
- Yang HM, Wu J, Li JY, Gu L, Zhou MF. Role of nucleation of bile liquid crystal in gallstone formation. *World J Gastroenterol* 2003;9:1791-1794
- Jungst D, Niemeyer A, Muller I, Zundt B, Meyer G, Wilhelmi M, del Pozo R. Mucin and phospholipids determine viscosity of gallbladder bile in patients with gallstones. *World J Gastroenterol* 2001;7:203-207
- Shi JS, Ma JY, Zhu LH, Pan BR, Wang ZR, Ma LS. Studies on gallstone in China. *World J Gastroenterol* 2001;7:593-596
- Lin QY, Du JP, Zhang MY, Yao YG, Li L, Cheng NS, Yan LN, Xiao LJ. Effect of apolipoprotein E gene Hha I restricting fragment length polymorphism on serum lipids in cholecystolithiasis. *World J Gastroenterol* 1999;5:228-230
- Han TQ, Zhang SD, Tang WH, Jiang ZY. Bile acids in serum and bile of patients with cholesterol gallstone. *World J Gastroenterol* 1998;4:82-84
- Zhao JC, Xiao LJ, Zhu H, Shu Y, Cheng NS. Changes of lipid metabolism in plasma, liver and bile during cholesterol gallstone formation in rabbit model. *World J Gastroenterol* 1998;4: 337-339
- Wu XT, Xiao LJ, Li XQ, Li JS. Detection of bacterial DNA from cholesterol gallstones by nested primers polymerase chain reaction. *World J Gastroenterol* 1998;4:234-237
- Wei JG, Wang YC, Du F, Yu HJ. Dynamic and ultrastructural study of sphincter of Oddi in early-stage cholelithiasis in rabbits with hypercholesterolemia. *World J Gastroenterol* 2000;6: 102-106
- Wang J, Luo J, Yu X. Study on biliary motility in cirrhotic patients with portal hypertension. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2000;8:35-36
- Muramatsu S, Sonobe K, Tohara K, Tanaka T, Mizumoto A, Ibuki R, Suzuki H, Itoh Z. Effect of truncal vagotomy on gallbladder bile kinetics in conscious dogs. *Neurogastroenterol Motil* 1999;11:357-364
- Liu CY, Liu JZ, Zhou JH, Wang HR, Li ZY, Li AJ, Liu KJ. TRH microinjection into DVC enhances motility of rabbits gallbladder via vagus nerve. *World J Gastroenterol* 1998;4:162-164
- Liu CY, Liu JZ, Li ZY, Liu KJ. The vagus nerve coordinates the motion of gallbladder and sphincter of Oddi in the interdigestive period in rabbits. *Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi* 2000;16:347-349
- Yang Z, Qiu F. Pericardial devascularization with splenectomy for the treatment of portal hypertension. *Zhonghua Waike Zazhi* 2000;38:645-648
- 金红旭, 吴硕东, 陈宪英. 门奇静脉断流术前血中胆囊动力相关激素的水平. *世界华人消化杂志* 2004;12:235-237
- Hassab MA. Gastroesophageal decongestion and splenectomy in the treatment of esophageal varices in bilharzial cirrhosis: further studies with a report on 355 operations. *Surgery* 1967; 61:169-176
- 姚常柏, 吴硕东, 夏振龙. 门奇静脉断流术对门脉高压症一氧化氮及氧自由基的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:28-31
- 徐新保, 蔡景修, 董家鸿, 何振平, 韩本立, 冷希圣. 肝硬化大鼠门静脉高压症不同手术方式对其肝脏的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:689-693
- Liu XG, Wang Y, Li GW. Embolization of the vena gastrica dextra in portal hypertension. *Zhonghua Waike Zazhi* 1986;24: 648-651
- Liu X, Gao H, Wang Y. Isolation of the lower esophagus and fundus of the stomach by specially designed forceps to avoid ectopic embolization during the process of coronary venous embolizing therapy. *Zhonghua Waike Zazhi* 1995;33:252-254
- Gao DM. A technic of limited gastric coronary vein embolization under direct vision for treatment of portal hypertension. *Zhonghua Waike Zazhi* 1990;28:136-139
- Tsukamoto M, Enjoji A, Ura K, Kanematsu T. Preserved extrinsic neural connection between gallbladder and residual stomach is essential to prevent dysmotility of gallbladder after distal gastrectomy. *Neurogastroenterol Motil* 2000;12:23-31
- Xie YF, Liu CY, Liu JZ. Nucleus raphe obscurus participates in regulation of gallbladder motility through vagus and sympathetic nerves in rabbits. *Chin J Physiol* 2002;45:101-107
- Kinoshita H, Imayama H, Hashino K, Aoyagi S. Study of cholelithiasis after gastrectomy. *Kurume Med J* 2000;47:105-108
- Hagiwara A, Imanishi T, Sakakura C, Otsuji E, Kitamura K, Itoi H, Yamagishi H. Subtotal gastrectomy for cancer located in the greater curvature of the middle stomach with prevention of the left gastric artery. *Am J Surg* 2002;183:692-696
- Vassilakis JS, Pechlivanides G, Fountos A, Zoras OJ, Xynos E. Roux-en-Y gastroenterostomy severely disturbs emptying of the gallbladder. *J Am Coll Surg* 1994;179:313-317
- Madacsy L, Velosy B, Szepes A, Szilvassy Z, Pavics L, Csernay L, Lonovics J. Effect of nitric oxide on gallbladder motility in patients with acalculous biliary pain: a cholescintigraphic study. *Dig Dis Sci* 2002;47:1975-1981
- Chen SD, Tsai SC, Shiau YC, Ho YJ, Kao CH. Evidence of gallbladder function changes in hepatoma after transcatheter arterial embolization by quantitative Tc-99m DISIDA cholescintigraphy. *Hepatogastroenterology* 2001;48:393-396
- Kao CH, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Chen SD. Evidence of impaired gallbladder function in patients with liver cirrhosis by quantitative radionuclide cholescintigraphy. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1301-1304
- Parkman HP, Pagano AP, Ryan JP. Investigation of endogenous neurotransmitters of guinea pig gallbladder using nicotinic agonist stimulation. *Dig Dis Sci* 1998;43:2237-2243
- Woods CM, Mawe GM, Shaffer EA, Tooouli J, T P Saccone G. Effects of bioactive agents on biliary motor function. *Curr Gastroenterol Rep* 2003;5:154-159
- Zhou JH, Liu CY, Zhang RH, Wang HR, Liu KJ. Effects of octreotide on gallbladder pressure and myoelectric activity of Oddi sphincter in rabbits. *World J Gastroenterol* 1998;4:238-241
- von Kiedrowski R, Huijghebaert S, Raedsch R. Mechanisms of cisapride affecting gallbladder motility. *Dig Dis Sci* 2001;46: 939-944
- Luiking YC, Akkermans LM, Peeters TL, Cnossen PJ, Nieuwenhuijs VB, Vanberge Henegouwen GP. Effects of motilin on human interdigestive gastrointestinal and gallbladder motility, and involvement of 5HT3 receptors. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14: 151-159
- Xynos E, Pechlivanides G, Zoras OJ, Chrysos E, Tzovaras G, Fountos A, Vassilakis JS. Reproducibility of gallbladder emptying scintigraphic studies. *J Nucl Med* 1994;35:835-839
- Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003; 83:633-671
- Garcia F, Kierbel A, Larocca MC, Gradilone SA, Splinter P, LaRusso NF, Marinelli RA. Epub 2001 Jan 17. The water channel aquaporin-8 is mainly intracellular in rat hepatocytes, and its plasma membrane insertion is stimulated by cyclic AMP. *J Biol Chem* 2001;276:12147-12152
- St-Pierre MV, Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Meier PJ. Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues. *J Exp Biol* 2001;204(Pt 10):1673-1686
- Hooiveld GJ, van Montfoort JE, Meijer DK, Muller M. Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport. *Eur J Pharm Sci* 2001; 12:525-543
- Pazzi P, Petroni ML, Prandini N, Adam JA, Gullini S, Northfield TC, Jazrawi RP. Postprandial refilling and turnover: specific gallbladder motor function defects in patients with gallstone recurrence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:787-794

药物与肝星状细胞的表型调控

裴晓丹, 吴建辉, 孙祖越, 曾小菲

裴晓丹, 曾小菲, 辽宁大学环境科学学院 辽宁省沈阳市 110036
吴建辉, 孙祖越, 上海市计划生育科学研究所药理毒理学研究室, 中国
生育调节药理毒理检测中心 上海市 200032
项目负责人: 孙祖越, 200036, 上海市计划生育科学研究所药理毒理学研
究室, 中国生育调节药理毒理检测中心. Sunzy64@163.com
电话: 021-64223344
收稿日期: 2004-09-24 接受日期: 2004-10-11

摘要

近年来,肝星状细胞在调节肝纤维化过程中的重要作用逐渐被人们所认识. 目前,对其表型调控的研究成为众多学者的研究热点. 本文对近年来众多能够调控肝星状细胞表型变化的药物及其作用机制做一简要的归纳.

裴晓丹, 吴建辉, 孙祖越, 曾小菲. 药物与肝星状细胞的表型调控. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2660-2663

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2660.asp>

0 引言

肝脏疾患是一类严重危害人们健康的疾病, 其中肝纤维化是这个过程的中间及关键环节, 肝星状细胞(Hepatic stellate cell, HSC)在肝纤维化过程中扮演着重要的角色, 他是激活整个事件的开端. HSC位于肝窦Disse间隙内, 在肝损伤过程中被激活经表型转化成为肌成纤维细胞, 表达各种细胞外信号传导通路, 产生大量以胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分和细胞因子, 是肝纤维化形成的中心环节^[1]. 目前, 对于能够影响HSC表型变化的药物研究成为当前研究的一个热点. 本文就对能够调控HSC的药物做一简要综述.

1 拮抗促纤维化细胞因子类药物

这类药物主要是通过拮抗促纤维化因子的活性, 从分子水平上干预纤维化的发生、发展, 其途径包括使用细胞因子抗体、细胞因子受体拮抗剂、信号传导阻断剂等. 包括苦参碱、奥曲肽、氨氯吡咪、细胞外调节蛋白激酶特异抑制剂PD98059和日本草药TJ-9等.

1.1 抗血小板衍生生长因子类药物 目前认为在众多的与肝组织炎症相关的多肽生长因子中, 血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)被认为是对人鼠HSC最为有效的丝裂源. PDGF是Mr33 000的蛋白, 由A、B两条多肽链组成二聚体结构. 可能存在AA、BB和AB 3种形式. 其中PDGF BB促HSC增生作用最强. PDGF对HSC的促增生作用就是通过PDGF受体酪氨酸激酶介导的细胞信号传导作用而实现的^[2]. 因此, 阻断细胞信号传导通路的药物可能成为拮抗促纤维化

细胞因子类的药物. 细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)特异性抑制剂PD98059作用HSC, 可减少PDGF诱导的ERK活性, 同时完全抑制HSC分裂^[3], 并且使HSC趋化性降低57%. 另外, PDGF可增加一种HSC细胞外的pH调节剂Na⁺/H⁺交换子(一种蛋白质)的活性^[4], 促使HSC发生分裂. 氨氯吡咪(amiloride)一个Na⁺/H⁺交换子的抑制剂, 可减低由PDGF诱导的细胞分裂. 故认为Na⁺/H⁺在调节HSC分裂方面起重要的作用. 据资料表明^[5], PDGF还可以导致粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)磷酸化, 促进ERK活化, 引起细胞内Ca²⁺浓度增加, 加快HSC内DNA合成和有丝分裂, 促进细胞从G₁期向S期转化. 奥曲肽^[6]是目前治疗肝硬化门脉高压症合并食管静脉曲张出血最理想的药物, 他能即刻明显降低HSC-T6内Ca²⁺浓度, 而Ca²⁺浓度与促HSC增生有直接的关系^[7], 因此奥曲肽可能成为抑制HSC增生的潜在性药物. TJ-9^[8](Sho-aiko-o)是日本的一种传统草药, 也可以抑制PDGF-B诱导的HSC增生及蛋白质合成. 1.2 抗转化生长因子类药物 转化生长因子β1(Transforming growth factor β1, TGFβ1)也是目前最强有力的促纤维化因子之一^[9]. TGFβ1的促纤维化作用可能是通过以下途径实现的: (1)随着细胞活化, 内源性的TGFβ1诱导PDGF受体增加, 使细胞对强烈促细胞分裂剂PDGF反应性增强. (2)TGFβ1受体变化, 使介导细胞增生或胞外基质生成的信号通路被打乱, 促使细胞大量增生. 据报道^[10], 氧化苦参碱作用于传代的HSC可减少HSC TGFβ1的分泌总量, 抑制TGFβ1的活化及mRNA的表达. 由此可见, 苦参碱抑制HSC TGFβ1分泌量的作用机制至少部分源自于抑制TGFβ1基因的逆转录作用. 根据新的研究发现, 前列腺E2 (Prostaglandin E2, PGE2)可以抑制由TGFβ1引起的HSC活化^[11]. 环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是生物体内催化前列腺素合成的关键酶, 虽然以前曾经有过报道说, 在HSC中发现过COX的表达^[12], 但是COX与由TGFβ引起的HSC活化之间的关系还不清楚. 用COX抑制剂NS398作用于HSC, 发现HSC大量表达I型胶原蛋白, 相反在HSC中加入外源性的PGE2, 观察到由TGFβ诱导的胶原生成被抑制. 另外, 一种叫做坎利酮(canrenone)的兴奋剂也可以减少由TGFβ引起的HSC活化^[13].

1.3 其他类细胞因子拮抗剂 维生素A是人类必须摄取的营养物质之一, 虽然在人体的各种细胞中都有他的存在, 但大部分维生素A储存在肝脏里, 特别是在HSC

中. 体外的研究显示, 维生素 A 可以调节 HSC 的增生和胶原蛋白的过量分泌, 肝脏纤维化通常与肝脏中的维生素水平降低有关^[14]. 但是我们对肝纤维化时, 是否 HSC 中的维生素水平也会下降仍不清楚. 最近有研究显示, HSC 激活时细胞内视黄醇类如视黄酸(retinoic acid, RA)的含量下降, 同时细胞液视黄醇结合蛋白(cellular retinol binding protein, CRBP)、视黄醇类核内受体RAR(retinoic acid receptor)及RXR(retinoid X receptor) mRNA 水平降低^[15-16], 他们是参与维生素 A 新陈代谢的关键物质, 故可以推测维生素 A 在调节 HSC 增生的过程中起到了一定的作用. 虽然其中的机制还不清楚, 但核激素受体, 如过氧化物酶增生体活化受体(peroxisome proliferator activated receptor, PPAR α , β and γ)可能起到了重要的作用^[17]. 因此, 维生素 A 也是一种潜在的细胞信号阻断剂.

HSC 还可以分泌一种叫做瘦体素(leptin)的细胞因子^[14], 他可以通过 ERK 途径抑制 HSC 凋亡, 是一种强烈的 HSC 增生的促效因子. 因此, 寻找相应的 leptin 抑制剂, 为抗 HSC 活化增生开辟了一条新途径.

2 清除自由基型药物

当肝脏损伤时, 许多病理炎症细胞可以产生大量自由基, 其主要成分为活性氧(reactive oxygen species, ROS). 这些自由基可引起脂质过氧化, 导致了一些细胞外信号调节激酶信号通路的改变, 从而引发 HSC 的活化及增生, 由此可见这类自由基在整个 HSC 激活事件过程中扮演了一个“导火线”的角色. 这类清除自由基类型的药物包括丹参、木犀草素和雌激素等.

2.1 丹参 抑制脂质过氧化是丹参抗 HSC 活化的重要机制之一^[15], 由丹参提取的单体 IH764-3, 是他的有效成分之一, IH764-3 作用于体外培养的 HSC, 能下调 FAK mRNA 的表达. FAK 为酪氨酸激酶家族中的一种, ROS 作用于 FAK, 导致 FAK 残基磷酸化, 并同胞质内某些信号蛋白中的 SH-2 区结合, 导致细胞发生磷酸化, 同时启动多种信号传导途径, 引起细胞的异常增生、分化和胶原大量生成. 研究显示^[16], 不同剂量的 IH764-3 干预 H₂O₂ 刺激的 HSC, 通过³H-胸腺嘧啶(³H-TdR)、³H-脯氨酸(³H-pro)掺入法测定 HSC 增生及胶原合成能力, 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 FAK mRNA 的表达. 不同剂量的 IH764-3(10, 20, 30, 40 mg/L)作用于 HSC 48 h 及 30 mg/L IH764-3 作用于 HSC 不同时间(12, 24, 48 h), 与单纯的 H₂O₂ 组相比, HSC 增生明显被抑制($P < 0.05$), 胶原合成能力降低($P < 0.05$), FAK mRNA 的表达下降. 丹参还可以减少 TGF β 1 的分泌总量和活性型 TGF β 1 的含量^[17]. HSC 激活后分泌的胶原上两条多肽链基因的启动子上均有 TGF β 1 的作用位点. 由此可见, TGF β 1 与胶原蛋白的相互作用至少有一部分是发生在转录水平上的. 因此推测丹参抑制 TGF β 1 刺激的大鼠肝星状细胞 I 型、

III 型胶原基因的表达, 这种作用可能有一部分是通过抑制胶原蛋白的基因转录而实现的. 研究还发现, 经丹参作用后的 HSC, Smad3 蛋白减少了^[18], Smad3 是 TGF- β 信号通路的中介分子, 被 SARA(Smad anchor for receptor activation)招募到 TGF- β 受体激酶上来进行磷酸化, 磷酸化诱导的 Smad3 寡聚化是 TGF- β 信号通路从 Smad3 与受体结合转向 Smad3 诱导基因表达的关键过程. 丹参减少了 Smad3 蛋白的表达, 打乱了 TGF β 的信号通路, 进而抑制了 TGF β 的表达、HSC 的增生和 I 型胶原蛋白的分泌. 另外, 丹参还可以诱导体外培养的 HSC 发生凋亡.

2.2 木犀草素 木犀草素是金银花、荆芥、菊花、白毛夏枯草等药物中主要的成分. 实验研究发现木犀草素可以抑制 HSC 增生及其胶原合成. 从 Wistar 大鼠肝脏分离培养 HSC, 并用³H-TdR 和³H-pro 同位素掺入实验、基因探针原位杂交等技术研究了木犀草素对 HSC 增生、胶原基因表达的影响^[19]. 研究表明当木犀草素的浓度分别达到 10 μ mol/L 和 20 μ mol/L 时可抑制 HSC 增生和胶原合成, 其作用呈剂量依赖关系; 25 μ mol/L 木犀草素使 I、III 型前胶原 mRNA 的表达降低, 其中 I 型前胶原基因表达的降低具有统计学差异. 国内外研究表明木犀草素为很强的自由基清除剂, 具有抑制 iNOS 表达和 NO 合成的作用^[20], 而肝纤维化过程中自由基和 NO 合成增加被认为是 HSC 活化和 ECM 合成增加的重要因素之一^[21].

2.3 雌激素 雌二醇及其衍生物具有很强的内源性抗氧化作用, 可以降低肝脏中脂质过氧化水平^[22]. 肝脏并非性激素作用的靶器官, 但肝脏中存在高亲和力、低容量的雌激素受体, 能对雌激素产生反应. 在 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化动物模型中, 将动物连续给予雌激素(苯甲酸雌二醇 1 mg/kg), 观察结果与纤维化模型相比, 肝星状细胞对 α -平滑肌肌动蛋白的表达明显被抑制. 同时, HSC 活化时, 分泌的 I、III 型胶原也减少, 故推断雌激素这种抑制 HSC 活化促 ECM 降解的作用可能与雌二醇的清除自由基作用有关.

3 诱导 HSC 凋亡的药物

自 1997 年 Saile *et al* 通过 HSC 的体内和体外研究发现, 在 HSC 激活的过程中, 伴随有细胞凋亡的发生, 通过诱导 HSC 凋亡可以抑制 HSC 的增生, 减少活化的 HSC 数量, 从而达到逆转肝纤维化发生的作用^[23]. 目前, 能够诱导 HSC 发生凋亡的药物有姜黄素、丹参、干扰素和整合素等.

3.1 姜黄素 姜黄素(curcumin)是热带植物姜黄的主要成分, 体外培养的肝星状细胞经 20, 40, 60 μ mol/L 姜黄素作用 24h 后, 流式细胞仪检测到明显的亚 G₁ 峰, 各组的凋亡指数(%)分别为 15.3 \pm 1.88, 26.7 \pm 2.79 和 37.6 \pm 4.38, 而对照组为 1.9 \pm 0.64, 差异性显著; 透射电镜下观察到细胞皱缩, 核染色质浓缩沿核膜排列并出现凋亡小体;

琼脂糖凝胶电泳上见到明显的DNA梯度带^[24]。据国外的相关资料的报道^[25]：姜黄素诱导HSC凋亡可能是通过激活过氧化物酶增生体活化受体PPAR- γ 的表达来实现的。当HSC活化时，PPAR- γ 的含量急剧减少。相反，用PPAR- γ 促效药刺激其表达，同样可以抑制HSC活化。而实验表明，姜黄素可以在活化的HSC中刺激PPAR- γ 的表达并抑制TGF β 受体的基因表达，打乱TGF β 的信号传导途径。由此推断，姜黄素对TGF- β 的抑制作用是通过增加PPAR- γ 活性来介导的。虽然，我们对这个过程的具体机制还不是十分清楚，但是该结果至少为姜黄素诱导HSC凋亡的机制提供一种新的解释。另外，姜黄素无毒的特点使他成为抗纤维化的潜在药物。

3.2 丹参 丹参作用于体外培养的HSC，48 h后在透视镜和流式细胞仪上均观察到了细胞凋亡。丹参是一种成分复杂的药物，他诱导HSC发生凋亡可能是通过多种途径来实现的。有人发现丹参可以促进激活的HSC大量表达死亡因子FasL(又称CD95-L)^[26]。死亡因子FasL与靶细胞膜上的特异受体Fas结合，启动凋亡程序导致细胞凋亡是机体内细胞凋亡的主要途径。其次，丹参干预整合素介导的HSC细胞信号转导也能促进HSC凋亡^[27]。整合素介导的HSC细胞信号转导并不是十分清楚，FAK可能起到了核心的作用。

3.3 整合素和干扰素 整合素是一类位于细胞表面的糖蛋白受体家族分子，也是HSC上的主要黏附受体，其配体为基质分子而非细胞因子，能识别黏附基质分子如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)三肽序列。用含有RGD的可溶性肽链序列阻断整合素与配体结合，将信号转入细胞，可诱导细胞凋亡。用可溶性的四肽序列RGDS作用于HSC，48 h后观察到凋亡调节蛋白p53表达增加，Bcl-2/Bax比率显著降低。

临床发现干扰素- α (interferon- α , INF- α)有特异性的抗肝纤维化作用，但其作用机制尚不清楚。有人用INF- α 作用于体内和体外培养的HSC，经TUNEL法检测后发现了细胞凋亡^[28-29]，故推断诱导HSC凋亡是其抗纤维化的机制之一。但也有人在体外培养的HSC中观察到了INF- α 抑制HSC凋亡的作用^[30]。究竟干扰素对HSC凋亡起什么作用，等待着进一步的探讨。

4 结语

综合目前的研究结果，HSC在逆转肝纤维化的过程中起到了关键性的作用。随着细胞生物技术、基因工程技术等技术的发展，各国学者着手于HSC表型变化的调控机制的研究已经取得了较大的突破。相信在不久的将来，一定会找到高效、无毒且针对HSC特异性表达的调控剂。

5 参考文献

- 1 聂广. 中药对肝脏细胞凋亡影响的研究. 中国中西医结合消化杂志 2002;9:249-253
- 2 程红球, 张赤志, 杨玲, 朱清静. PDGF受体酪氨酸激酶介导的细胞信号在HSC增生中的作用. 中西医结合肝病杂志 2002; 12:63-65
- 3 Gao R, Ball DK, Perbal B, Brigstock DR. Connective tissue growth factor induces c-fos gene activation and cell proliferation through p44/42 MAP kinase in primary rat hepatic stellate cell. *J Hepatol* 2004;40:431-438
- 4 Inoue T, Jackson EK. Strong antiproliferative effects of baicalin in cultured rat hepatic stellate cells. *Eur J Pharmacol* 1999;378:127-135
- 5 Carloni V, Pinzani M, Giusti S, Romanelli RG, Parola M, Bellomo G, Failli P, Hamilton AD, Sebt SM, Laffi G, Gentilini P. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase by PDGF is dependent on ras in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:131-140
- 6 黄春, 丁惠国, 徐燕琳, 唐淑珍, 王宝恩, 贾继东, 赵春惠. 奥曲肽对肝星状细胞钙离子浓度的影响及其意义. 中华消化杂志 2002; 22:508-510
- 7 Yee HF Jr. Ca⁺ and rho signaling pathways: two paths to hepatic stellate cell contraction. *Hepatology* 2001;33:1007-1008
- 8 Kayano K, Sakaida I, Uchida K, Okita K. Inhibitory effect of the herbal medicine Sho-Saiko-to (TJ-9) on cell proliferation and procollagen gene expression in cultured rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1998;29:642-649
- 9 Roth-Eichhom S, Kuhl K, Gressner AM. Subcellular localization of transforming growth factor β and the latent TGF β binding protein in rat hepatocytes and hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998;28:1588-1596
- 10 卢清, 张继明, 尹有宽, 张清波, 郭祥惠. 氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞产生转化生长因子 β 1的影响. 中华医学实践杂志 2003; 2:675-677
- 11 Hui AY, Dannenberg AJ, Sung JJ, Subbaramaiah K, Du B, Olinga P, Friedman SL. Prostaglandin E(2) inhibits transforming growth factor beta1-mediated induction of collagen alpha (1)(I) in hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004;41:251-258
- 12 刘平, 河田则文, 沟口靖宏, 森泽成司. 丹酚酰性酸B对大鼠肝黏附性细胞不加氧酶活性及其产物的影响. 中国中药杂志 1994; 19:110-113
- 13 Caligiuri A, De Franco RM, Romanelli RG, Gentilini A, Meucci M, Failli P, Mazzetti L, Rombouts K, Geerts A, Vanasia M, Gentilini P, Marra F, Pinzani M. Antifibrogenic effects of canrenone, an antialdosterone drug, on human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2003;124:504-520
- 14 Lepreux S, Bioulac-Sage P, Gabbiani G, Sapin V, Housset C, Rosenbaum J, Balabaud C, Desmouliere A. Cellular retinol-binding protein-1 expression in normal and fibrotic/cirrhotic human liver: different patterns of expression in hepatic stellate cells and (myo)fibroblast subpopulations. *J Hepatol* 2004; 40:774-780
- 15 Chen A, Davis BH. The DNA binding protein BTEB mediates acetaldehyde-induced, jun N-terminal kinase-dependent α 1(I) collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol* 2000;20:2818-2826
- 16 Chen A, Davis BH. UV irradiation activates JNK and increases α 1(I) collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1999;274:158-164
- 17 Hellemans K, Rombouts K, Quartier E, Dittie AS, Knorr A, Michalik L, Rogiers V, Schuit F, Wahli W, Geerts A. PPARbeta regulates vitamin A metabolism-related gene expression in hepatic stellate cells undergoing activation. *J Lipid Res* 2003; 44:280-295
- 18 Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, Anania FA. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase(ERK) and Akt phosphorylation. *FASEB J* 2004;19:1612-1614
- 19 蒋树林, 姚希贤, 吕涛. 丹参抑制大鼠肝线粒体脂质过氧化. 世界华人消化杂志 2002;10:1253-1256
- 20 刘丽, 姜慧卿, 张晓岚. 丹参单体IH764-3对H₂O₂刺激肝星状细胞增生和胶原合成的影响及其机制. 中国应用生理学杂志 2003; 19:78-81
- 21 王海南, 胡义扬, 洪嘉禾, 刘平, 朱大元. 丹参酚酸B盐对肝星状细胞增殖与TGF β 1信号转导的影响. 中华肝脏病杂志 2002;10: 382-385

- 22 Zhao JF, Liu CH, Hu YY, Xu LM, Liu P, Liu C. Effect of salvianolic acid B on Smad3 expression in hepatic stellate cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:102-105
- 23 赵稳兴, 梁崇礼, 陈忠民, 庞荣清, 赵彬, 陈志龙. 木犀草素抑制肝星状细胞增殖及其胶原合成. *中华肝脏病杂志* 2002;10:204-207
- 24 Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. Effect of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their activity relationship. *Biochem Pharmacol* 1999;58:759-765
- 25 Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidant, resveratrol, quercetin and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kuffer cells. *Hepatology* 1998;27:1265-1274
- 26 Liu Y, Shimizu I, Omoya T, Ito S, Gu XS, Zuo J. Protective effect of estradiol on hepatocytic oxidation damage[J]. *World J Gastroenterol* 2002;8:363-366
- 27 Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cells proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997;151:1265-1272
- 28 舒建昌, 赵景润, 杨冬华, 沈雁, 钟灿灿, 吕霞, 汤绍辉. 姜黄素对肝星状细胞增生与凋亡的影响. *中华消化杂志* 2004;24:282-285
- 29 Zheng S, Chen A. Activation of PPAR- γ is required for curcumin to induce apoptosis and to inhibit the expression of extracellular matrix genes in hepatic stellate cell *in vitro*. *Biochem J* 2004;384:149-157
- 30 罗云, 戴立里, 沈鼎明, 姚云清, 张大志, 王波. 丹参诱导大鼠肝星状细胞凋亡作用的研究. *重庆医学* 2003;32:1071-1072
- 31 姜慧卿, 张晓岚, 刘丽. 丹参单体通过下调粘着斑激酶诱导 H_2O_2 刺激的肝星状细胞凋亡. *中国病理生理杂志* 2003;19:18-21
- 32 许伟华, 吕晓霞, 朱菊人. 肝纤维化大鼠肝星状细胞凋亡体内研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:972-974
- 33 许伟华, 吕晓霞, 朱菊人. α 干扰素对肝星状细胞凋亡及其基因表达的影响. *中华肝脏病杂志* 2003;11:633-634
- 34 Saile B, Eisenbach C, El-Armouche H. Antiapoptotic effect of interferon-alpha on hepatic stellate cells (HSC): a novel pathway of IFN-alpha signal transduction via Janus kinase 2 (JAK2) and caspase-8. *Eur J Cell Biol* 2003;82:31-41

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 审稿要点

《World Journal of Gastroenterology, WJG》根据编委的审稿意见, 来稿分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审等项处理. WJG 为了确保其出版的每篇论文的学术质量, 特制定了以下评审要点. (1)题名: 是否准确反映了研究工作的科学问题, 内容是否简明而有特色. 若不符, 请提出具体修改意见. (2)摘要: 是否明确指出了研究的背景与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论, 创新点和重点科学问题是否与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论相符. (3)引言: 是否包括该研究的目的是与其他相关研究的关系. (4)材料和方法: 有无特色, 如大样本、安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验、特殊病例、细胞或组织样品; 研究方法和技术的有无创新性、系统性或特色. 改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当. (5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足. 临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果. (6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论. (7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况. (8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.

World Journal of Gastroenterology 电子版

《World Journal of Gastroenterology, WJG》网(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)于 2003-04-15 开通, 截止 2003-10-26 点击率已达 452392 人次. WJG 电子版由以下 7 个栏目组成. (1)期刊介绍: 编委成员, 编委成员简介, 编辑, 检索系统收录, 影响因子. (2)出版: 出版, 版权, 征订. (3)投稿: 投稿细则、文献综述、研究论文、研究快报、病例报告等的书写格式. (4)新闻: IM 收录期刊、JCR 报道的影响因子. (5)投稿查询: 提交用户名和密码, 可查询到稿件的全部流程, 共计 28 项. (6)电子期刊: 现刊和过刊(1995-2003), 全刊索引. WJG 电子期刊功能包括 HTM、PDF、摘要、相关性文献、被引频次、点击次数、下载次数、评论等. (7)参考文献链接: WJG 对刊出论文的全部参考文献与原文的首页进行校对, 保证了每条参考文献的作者、题名、年、卷号、页码、PMID 等内容正确性, 并与 PubMed 和 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp> 中的摘要及全文进行链接, 提高了参考文献的引用准确性, 也方便了读者查阅参考文献的全文及摘要.

趋化因子与慢性丙型肝炎

冯志华, 卢丙仑, 李 军, 白宪光, 贾战生, 谢玉梅, 郝春秋, 陈伟红

冯志华, 李军, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院检验科分子生物学室 陕西省西安市 710038

卢丙仑, 中国人民解放军第四军医大学西京医院 陕西省西安市 710032
白宪光, 贾战生, 谢玉梅, 郝春秋, 陈伟红, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染病科 陕西省西安市 710038

项目负责人: 冯志华, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院检验科分子生物学室, fengzh@fmmu.edu.cn

电话: 029-3377165 传真: 029-83377165

收稿日期: 2004-07-31 接受日期: 2004-09-19

摘要

越来越多的实验证实, 慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)患者肝脏局部炎症产生的趋化因子(chemokines, CK)在淋巴细胞的迁移和募集中起着至关重要的作用, 他不仅与肝细胞损伤程度密切相关, 可能是肝病加重的潜在预兆, 而且与干扰素治疗后的应答反应密切相关. 因此, 本文就趋化因子的分类、分泌细胞、趋化细胞的类型, 趋化因子与慢性HCV感染肝脏炎症程度的关系以及趋化因子对慢性HCV感染干扰素治疗应答的影响等进行了简要的综述.

冯志华, 卢丙仑, 李军, 白宪光, 贾战生, 谢玉梅, 郝春秋, 陈伟红. 趋化因子与慢性丙型肝炎. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2664-2667

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2664.asp>

0 引言

慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)的组织学特点是: 汇管区大量淋巴细胞浸润, 破坏界板, 侵袭周围组织, 导致汇管区周碎片样坏死^[1]. T淋巴细胞是肝损害炎症区域内的优势细胞^[2], 越来越多的证据支持, 炎症病变从肝门部扩展到汇管区(periportal)和小叶内与肝细胞损伤程度密切相关^[3-4], 他可能是肝病加重的潜在预兆. 而肝脏炎症局部产生的趋化因子(chemokines, CK)最有可能在CHC患者体内淋巴细胞的迁移和募集中起到至关重要的作用^[5-6]. 因此, 阐明CHC患者体内T细胞迁移和募集至肝脏的机制, 有利于阐明病毒性肝炎的发病机制.

1 趋化因子的分类、分泌细胞、趋化细胞的类型

趋化因子由白细胞分泌, 属于低分子质量(8 000-18 000 u)细胞因子超家族. 这类细胞因子对中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞等, 具有很强大的趋化和激活作用, 因此, 这类细胞因子在机体的抗感染中具有重要的作用. 业已证实, 趋化因子分为4群, 其中最大的家族是CXC和CC亚族^[5, 7-10].

1.1 CXC亚族(α 亚族) 除NAP-4以外, 其余成员分

子中N端第1、第2个半胱氨酸残基(Cys)被另一个氨基酸隔开. CXC亚族又分成包含ELR基序的CXC趋化因子和非-ELR CXC趋化因子2类. 前者包含3个氨基酸残基ELR(谷氨酸-亮氨酸-精氨酸, Glu-Leu-Arg), 以白介素8(IL-8)和C5a为代表, 主要作用于嗜中性粒细胞; 后者则包括对T细胞具有趋化作用和对血管具有他丁活性的 γ -干扰素诱生的单核因子(monokine induced by interferon- γ , Mig)、IFN- γ 诱生蛋白-10(IFN- γ inducible protein 10, IP-10)以及干扰素诱导T细胞 α 趋化剂(Interferon-inducible T cell α chemoattractant, I-TAC)等. 编码这个亚族成员的基因定位于第4号染色体长臂, 氨基酸水平上的同源性在25-90%.

1.2 CC亚族(β 亚族) N端第1、2个半胱氨酸残基(Cys)与其他的氨基酸相邻. 他包括: 巨噬细胞炎症蛋白-1 α (MIP-1 α), 巨噬细胞炎症蛋白1 β (MIP-1 β), 由正常T细胞表达和分泌, 活化时表达下降的因子(reduced upon activation, normal T expressed and secreted, RANTES), 单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和单核细胞趋化蛋白-2(monocyte chemoattractant protein-2, MCP-2)等, 主要趋化单核细胞. 该亚族成员的基因定位于第17号染色体长臂, 而且各成员的基因密切连锁, 氨基酸水平上同源性在25-70%. CXC和CC两个亚族之间同源性为21-31%.

不同的趋化因子亚族吸引不同的白细胞亚群. 一般来说, CC趋化因子吸引单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和T细胞. CXC亚族中的ELR CXC趋化因子主要趋化中性粒细胞, 非ELR CXC趋化因子则趋化吸引淋巴细胞, 尤其以IFN- γ 诱导的IP-10、Mig以及I-TAC为著, 他们选择性地趋化Th1型细胞活化的T细胞和IL-12活化的T细胞^[7]. 趋化因子最后通过结合到特异性靶细胞表面的受体而发挥作用.

2 趋化因子与慢性HCV感染肝脏炎症程度的关系

越来越多的实验证实, 慢性丙型肝炎患者肝脏的病理损害是由肝脏对病毒产生免疫应答所致^[11-13]. 因而, 选择性地募集有产生细胞因子(如Th1类细胞因子IFN- γ 和TNF- α)能力的效应T细胞至肝脏, 对于一个有效的抗病毒应答是至关重要的.

2.1 IP-10, Mig与CHC肝脏炎症 已有的研究表明, CHC患者肝脏内CXC趋化因子IP-10和Mig的表达增

加, 而且这种表达的增加, 与 T 细胞和 NK 细胞的募集至肝脏密切相关^[8-10], 与患者肝脏小叶内炎症活动程度相关^[14-17]. Harvey *et al*^[18]应用原位杂交技术发现, 募集活化 T 淋巴细胞的 IP-10 在慢性 HCV 感染过程中表达于肝组织. IP-10 受体表达在肝脏而非血液的大部分 T 淋巴细胞上. 肝小叶内优势的 CD8⁺ T 淋巴细胞, 几乎均一地表达 CXC 受体 3(CXCR3). 他们认为 IP-10 mRNA 的表达与小叶内坏死性炎症相关, 而与汇管区的炎症和纤维化程度无关. 这些结果支持: 肝细胞内 IP-10 的表达由 HCV 诱导. 据此他们推测, 肝内 IP-10 的表达可能在慢性 HCV 感染发病中非常重要, 炎症细胞募集到肝小叶可能是肝病进展的重要预测指标. 但是, 关于 IP-10 和 Mig 的细胞来源意见不一致. 一种研究认为, 其主要来自于肝窦内皮细胞^[14]; 而 Harvey *et al* 通过免疫组化的方法进一步在肝组织中寻找 IP-10 的细胞来源, 发现 IP-10 表达于肝细胞, 非肝内其他细胞类型, 而且多在肝小叶炎症反应强烈区域内^[14], 他们认为, IP-10 主要来自于炎症活动周围区域的肝细胞^[14].

2.2 I-TAC 与慢性 HCV 感染 Helbig *et al*^[19]的最新研究表明, 趋化因子 I-TAC 在趋化 T 细胞至 HCV 感染肝脏中起重要作用. 这是因为, 在 CHC 肝内 I-TAC mRNA 和蛋白水平持续地、强有力地上调, 而且 mRNA 表达水平与肝门部和小叶内炎症程度成正比. 据此他们认为, 在 HCV 感染应答中, IP-10、Mig 和 I-TAC 的表达造成一种强烈的吸引 T 细胞至肝脏的刺激. 这样不仅帮助机体清除感染肝细胞, 而且通过分泌的损害肝脏的炎症递质导致肝病的进展. Helbig *et al* 又进一步对 HCV 感染肝组织进行免疫组织化学分析, 调查了 I-TAC 的细胞来源. 结果发现 I-TAC 几乎专一地表达于肝细胞, 仅少量表达于肝窦内皮细胞. 但 I-TAC 不是表达于所有的肝细胞, I-TAC 不表达于正常肝细胞, 只表达于炎症活动较重区域的肝细胞^[19]. 这些结果与 Harvey *et al*^[18]发现的 CHC 患者肝内 IP-10 的表达方式一致. 他们还发现于肝窦内皮细胞仅少量表达. 由此可见, CHC 体内肝细胞在 CXCR3 配体的产生中起重要作用. 为调查 I-TAC 表达的类型和刺激信号来源, Helbig *et al* 用 IFN- α 和 IFN- β 刺激体外培养的 Huh-7 细胞, 结果导致细胞表达 I-TAC mRNA 和分泌 I-TAC 增加. 这与 Widney *et al*, Mohan *et al* 的研究结果一致^[20-23], 也就是说, IFN 是 I-TAC 产生的刺激剂. 但有趣的是, Karla *et al* 将 IFN- α 单独与 Huh-7 孵育, 结果未检测到 I-TAC 的表达, 而当联合了 IFN- β , I-TAC mRNA 及其蛋白表达增加. 鉴于 CHC 肝内和血清中 TNF- α 和 TNF- β 的表达水平也增加^[24-27], 他们推测, 这些细胞因子刺激 CHC 肝内 I-TAC 的表达, 而 I-TAC 表达的增加, 加重肝脏炎症细胞浸润, 从而加重肝细胞的损害, 加重肝病^[19].

麻疹病毒^[28]和 HIV gp120 蛋白^[29]能诱导 IP-10、RANTES 等表达, 呼吸道合胞病毒^[30]感染呼吸道上皮细胞能引起 I-TAC 表达, 那么, 慢性 HCV 感染肝内 I-TAC

表达的增加, 是否由感染的 HCV 直接诱导或由 HCV 调节? HCV 蛋白能够调节趋化因子 IL-8^[31]和 RANTES 在 Huh-7 细胞中的表达, 支持上述猜测. 故 Helbig *et al* 将 HCV 基因或亚基因复制封闭后, 则在培养细胞中检测不到 I-TAC 的表达; 若将 HCV 转染 Huh-7 细胞, 则在转染后 8 h, 就可在细胞中检测到瞬时表达的 I-TAC mRNA. 可见这种表达的增加, 不是由 HCV 蛋白所致, 最可能是细胞内 dsRNA(包括 HCV RNA)应答激活的结果^[32].

2.3 MCP-1, RANTES 与慢性 HCV 感染 CC 趋化因子单核细胞趋化性蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)是一种强有力的趋化因子, 他在慢性 HCV 感染肝脏中表达上调, 主要的表达细胞为活化的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC). Soo *et al*^[33]于 2002 年最先提供了 HCV 慢性感染者中 HCV 抗原成分诱生 CC 趋化因子的证据. 他们发现全长基因 HCV 在 HeLa, Huh7 和 HepG2 细胞的表达可以诱导 CC 趋化因子 RANTES 和 MCP-1 mRNA 水平的提高和其蛋白的表达. 报告基因分析显示: 转录起始位点上游的微量的 MCP-1 启动子(包含 128 个核苷酸)足以介导 HCV 有效地活化. 从电泳迁移分析和 AP-1 抗体转换得知, HCV 的转染可以上调 AP-1 结合活性和 C-jun 转录子. 同样发现, RANTES 转录起始位点上游的微量的启动子(181 个核苷酸)也足以介导 HCV 有效地活化. 在 HeLa 细胞中, HCV C 和 NS5A 分别能上调 MCP-1 和 RANTES 的启动子活性; 而在 Huh7 细胞中, 仅 NS5A 对两种启动子有微弱的影响; 令人意想不到是, C 区则诱导两种启动子活性的降低. 英国牛津大学人类遗传学中心 Hellier *et al* 的研究结果同样支持 CC 趋化因子受体 CCR5, CCR2, CCR3 和他们的配体 RANTES, MCP-1, MCP-2 以及 MIP- α 1 与 HCV 感染后的免疫应答和淋巴细胞选择性的募集至肝脏相关, 而且 CCR5 及其配体 RANTES 和 MCP-2 的基因变异可能改变 HCV 感染的后果. 他们研究了上述基因的 20 个多态性, 并在欧洲人群中调查了这些多态性与 HCV 持续携带、肝病的严重程度、肝脏的炎症以及对治疗应答的关系. 结果发现, CCR5-delta32 变异的患者常常汇管区炎症较轻、仅有轻微的纤维组织增生; 汇管区有严重炎症改变的患者很少存在 RANTES 基因启动子-403 位置变异; MCP-2 Q46K 中一个氨基酸改变将导致纤维化程度加重. 据此他们推测, CCR5-delta32, RANTES-403 以及 MCP-2 Q46K 的多态性可能改变 HCV 感染的结果. 同年, 德国雷根斯堡大学内科的 Muhlbauer 采用实时 PCR 定量法分析了 58 例 HCV 患者肝内 MCP-1 mRNA 的表达, ELISA 法检测细胞因子诱导的活化的 HSC 分泌的 MCP-1 的水平. 用 MCP-1 启动子序列(-2 511~-2 528)探针(在 -2 518 位有或没有 A-G 变异), 进行迁移转换分析(Mobility-shift). 结果表明, MCP-1 基因型的频率在 HCV 患者组和对照组中不同. 但是 G 等位基因携带则在 HCV 患者组中出现

更频繁,同时伴随着更加严重的炎症浸润和纤维化增生。同样,在纤维化较重和G等位基因携带的患者组中,MCP-1 mRNA的水平更高。而且,从G等位基因携带患者分离的细胞因子诱导的HSC分泌的MCP-1也较高。因此,MCP-1基因的多态性不仅与MCP-1的表达相关,同时也与HCV相关肝病的严重程度相关。提示:影响肝内MCP-1表达的-2518 MCP-1 G等位基因的继承,可能使HCV患者病情向炎症浸润更加严重,纤维组织增生更加明显的方向发展。

3 趋化因子对慢性HCV感染干扰素治疗应答的影响

日本学者Konishi *et al*在105例CHC患者中,调查了趋化因子及其受体遗传多态性(包括对T细胞分泌具有上调活性的(RANTES)-403G/C, CC亚族受体5(CCR5)-Delta32和59029G/A,和CC亚族受体2(CCR2)V64I)对单剂干扰素治疗效果的影响。结果发现:患者的性别、年龄、肝组织炎症的分级、治疗前ALT水平、干扰素治疗的剂量以及趋化因子及受体多态性出现的频率在CHC组和持续应答对照组无明显差异。而低病毒载量、HCV血清2型和表达CCR5-59029G/G的CHC组与持续应答对照组有明显差异。多重回归分析显示,低病毒载量、HCV血清2型和CCR5 59029G/G的表达与持续应答有关。他们认为,CCR5-59029是宿主遗传因子,他与CHC患者干扰素治疗的应答有关。

无独有偶,德国波恩威廉大学的Ahlenstiel *et al*也发现CCR5影响慢性HCV感染者抗病毒免疫应答能力。他们认为,一个有效的针对HCV感染的免疫应答需将炎症细胞活化并募集至肝脏,而在此过程中,趋化因子竭尽全力的起趋向性和免疫调节作用,所以趋化因子可能在免疫病理以及病毒清除中起着至关重要的作用,尤其是CCl₃(MIP-1 α)、CCl₄(MIP-1 β)和CCl₅(RANTES)与其相应受体的相互作用,可能在介导分泌Th1类细胞因子的Th细胞和CTL的募集、分化、定位、和激活中是至关重要。

总之,肝脏内趋化因子表达水平和CHC炎症活动程度密切相关,趋化因子信号在调节CHC重大的病理事件中起至关重要的作用,这也为阻止或调节趋化因子的活化和表达,从而阻止肝病进程,开创了新的途径。

4 参考文献

- Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging and grading in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2001;36:399-406
- Jarmay K, Karacsony G, Ozsvar Z, Nagy I, Lonovics J, Schaff Z. Assessment of histological features in chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2002;49:239-243
- Vadan R, Gheorghe L, Becheanu G, Iacob R, Iacob S, Gheorghe C. Predictive factors for the severity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C and moderate alcohol consumption. *Rom J Gastroenterol* 2003;12:183-187
- Poynard T, Imbert-Bismut F, Munteanu M, Messous D, Myers

- RP, Thabut D, Ratzin V, Mercadier A, Benhamou Y, Hainque B. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. *Comp Hepatol* 2004;3:8
- 陆荫英, 成军, 张玲霞. 趋化因子与病毒性肝炎的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12:414-417
- 胡迎宾, 田德安, 刘南植. 趋化因子与肝病的研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:1040-1042
- Apolinario A, Majano PL, Alvarez-Perez E, Saez A, Lozano C, Vargas J, Garcia-Monzon C. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2861-2870
- 杨春康, 陈道达, 田源, 张景辉. 大肠癌细胞可产生趋化因子IP-10. *世界华人消化杂志* 2003;11:1703-1705
- Yan C, Zhu ZG, Yu YY, Ji J, Zhang Y, Ji YB, Yan M, Chen J, Liu BY, Yin HR, Lin YZ. Expression of vascular endothelial growth factor C and chemokine receptor CCR7 in gastric carcinoma and their values in predicting lymph node metastasis. *World J Gastroenterol* 2004;10:783-790
- Jiang Y, Gu XP, Qiu YD, Sun XM, Chen LL, Zhang LH, Ding YT. Ischemic preconditioning decreases C-X-C chemokine expression and neutrophil accumulation early after liver transplantation in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:2025-2029
- Freeman AJ, Pan Y, Harvey CE, Post JJ, Law MG, White PA, Rawlinson WD, Lloyd AR, Marinos G, Ffrench RA. The presence of an intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response is associated with low viral load in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2003;38:349-356
- Tseng CT, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR. Characterization of liver T-cell receptor gamma delta T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence for these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infections. *Hepatology* 2001;33:1312-1320
- Patzwahl R, Meier V, Ramadori G, Mihm S. Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization. *J Virol* 2001;75:1332-1338
- Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 2003;74:360-369
- Mihm S, Schweyer S, Ramadori G. Expression of the chemokine IP-10 correlates with the accumulation of hepatic IFN-gamma and IL-18 mRNA in chronic hepatitis C but not in hepatitis B. *J Med Virol* 2003;70:562-570
- Arai K, Liu ZX, Lane T, Dennert G. IP-10 and Mig facilitate accumulation of T cells in the virus-infected liver. *Cell Immunol* 2002;219:48-56
- Itoh Y, Morita A, Nishioji K, Narumi S, Toyama T, Daimon Y, Nakamura H, Kirishima T, Okanoue T. Clinical significance of elevated serum interferon-inducible protein-10 levels in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum transaminase levels. *J Viral Hepat* 2001;8:341-348
- Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 2003;74:360-369
- Helbig KJ, Ruszkiewicz A, Semendric L, Harley HA, McColl SR, Beard MR. Expression of the CXCR3 ligand I-TAC by hepatocytes in chronic hepatitis C and its correlation with hepatic inflammation. *Hepatology* 2004;39:1220-1229
- Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. IFN- γ /STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple chemokines and adhesion molecules: a critical role of IRF-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G1044-G1052
- Mohan K, Ding Z, Hanly J, Issekutz TB. IFN-gamma-inducible T cell alpha chemoattractant is a potent stimulator of normal human blood T lymphocyte transendothelial migration:

- differential regulation by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 2002;168:6420-6428
- 22 Kraft M, Riedel S, Maaser C, Kucharzik T, Steinbuechel A, Domschke W, Luegering N. IFN-gamma synergizes with TNF-alpha but not with viable *H pylori* in up-regulating CXC chemokine secretion in gastric epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2001;126:474-481
 - 23 Hamilton NH, Banyer JL, Hapel AJ, Mahalingam S, Ramsay AJ, Ramshaw IA, Thomson SA. IFN-gamma regulates murine interferon-inducible T cell alpha chemokine (I-TAC) expression in dendritic cell lines and during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Scand J Immunol* 2002; 55:171-177
 - 24 Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2003;71:212-218
 - 25 Gochee PA, Jonsson JR, Clouston AD, Pandeya N, Purdie DM, Powell EE. Steatosis in chronic hepatitis C: association with increased messenger RNA expression of collagen I, tumor necrosis factor-alpha and cytochrome P450 2E1. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:386-392
 - 26 Cheng PL, Chang MH, Chao CH, Lee YH. Hepatitis C viral proteins interact with Smad3 and differentially regulate TGF-beta/Smad3-mediated transcriptional activation. *Oncogene* 2004;23:7821-7838
 - 27 Kasprzak A, Zabel M, Biczysko W, Wysocki J, Adamek A, Spachacz R, Surdyk-Zasada J. Expression of cytokines (TNF-alpha, IL-1alpha, and IL-2) in chronic hepatitis C: comparative hybridocytochemical and immunocytochemical study in children and adult patients. *J Histochem Cytochem* 2004;52: 29-38
 - 28 Patterson CE, Daley JK, Echols LA, Lane TE, Rall GF. Measles virus infection induces chemokine synthesis by neurons. *J Immunol* 2003;171:3102-3109
 - 29 Asensio VC, Maier J, Milner R, Boztug K, Kincaid C, Moulard M, Phillipson C, Lindsley K, Krucker T, Fox HS, Campbell IL. Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Virol* 2001;75:7067-7077
 - 30 Zhang Y, Luxon BA, Casola A, Garofalo RP, Jamaluddin M, Brasier AR. Expression of respiratory syncytial virus-induced chemokine gene networks in lower airway epithelial cells revealed by cDNA microarrays. *J Virol* 2001;75:9044-9058
 - 31 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106
 - 32 Fredericksen B, Akkaraju GR, Foy E, Wang C, Pflugheber J, Chen ZJ, Gale M Jr. Activation of the interferon-beta promoter during hepatitis C virus RNA replication. *Viral Immunol* 2002; 15:29-40
 - 33 Soo HM, Garzino-Demo A, Hong W, Tan YH, Tan YJ, Goh PY, Lim SG, Lim SP. Expression of a full-length hepatitis C virus cDNA up-regulates the expression of CC chemokines MCP-1 and RANTES. *Virology* 2002;303:253-277

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 排版印刷

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求。WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用。WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切。北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订。WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美。

World Journal of Gastroenterology 发行

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》2003 年印刷版共发行 973 份, 其中国内邮局征订 168 份, 分布在 27 个省市自治区; 国外发行 105 份, 分布在 56 个国家和地区; 向承担国家 973 和 863 及国家自然科学基金项目负责人赠送 700 份。让更多的国际胃肠病学和肝病学专家阅读和使用 WJG 发表的具有我国特色及国际先进水平的学术论文, WJG 向美国胃肠病学会会员, 美国肝病学会会员, 美国癌症研究会会员免费提供每期的全文电子版, 目前每期电子版的发行量已达 21200 份。

肝肾综合征的发病机制的研究进展

王静艳, 刘 沛

王静艳, 刘沛, 中国医科大学第二临床学院传染科 辽宁省沈阳市 110004
国家自然科学基金资助, No. 30270607
项目负责人: 刘沛, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号, 中国医科大学附属第二医院感染科. sylupei@yahoo.com
电话: 024-83956962 传真: 024-83956451
收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-08-25

摘要

肝肾综合征(HRS)是严重肝病时发生的一种进行性、功能性肾功不全. 尽管从1950年就开始了对其进行研究, 但到目前为止其发病机制仍不十分清楚. HRS发生主要为肾血流量减少, 肾小球滤过率降低而导致的尿量减少和尿素氮增高. 随着跨膜信息传递机制研究的进展, 对HRS的研究热点集中到了肾血流量减少的机制上, 就此加以综述.

王静艳, 刘沛. 肝肾综合征的发病机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12(11):2668-2670

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2668.asp>

0 引言

肝肾综合征(hepatorenal syndrome, HRS)是严重肝病时发生的一种进行性、功能性肾功不全. HRS不同于原发有肾脏疾病的肾衰竭, 他缺乏后者所具有的临床、实验室和组织学的改变. 多见于肝硬化晚期、重型肝炎、暴发性肝衰竭等慢性肝病终末期. 80-100%的患者在诊断后1 mo内死亡. 目前认为HRS的发生是由于肾血管收缩而造成的肾脏明显低灌注的结果, 肾脏的低灌注是动脉循环灌注不足的表现, 而後者的出现是全身动脉扩张的极端表现^[1]. 早在19世纪末期就有人对HRS的临床表现进行了描述. 肝硬化患者并胃肠出血、血容量不足时, 放腹水或外科手术等, 极易诱发肾功损伤而引起HRS. 患者通常由于体循环的损害, 动脉压降低, 导致肾小球滤过率(GFR)降低. 将肝硬化并发HRS患者的肾脏移植给慢性肾衰竭的患者, 能够使其重新获得正常的肾功能. 肝移植可使肝硬化合并HRS的肾脏重新获得正常的肾功能. 由此证实了HRS时肾功的损伤为功能性肾衰竭. 1996年国际腹水club举行了研讨会, 对HRS做了明确的定义, 即在慢性肝病、进展性肝功衰竭和门脉高压的患者存在损害肾功能的因素-动脉循环和内分泌性血管活性物质的异常; 在肾内循环, 肾血管明显收缩使GFR明显降低, 而肾外循环, 动脉血管舒张, 导致整个机体血管阻力下降和低血压. 因此, HRS的研究主要集中在寻找影响肾血管收缩和体循环血管舒张的体液因子上. 现在已经明确血管紧张素II、

内皮素、前列腺素等血管活性因子在HRS中起着一定的作用. 但是, HRS的病理生理和发病机制尚未完全阐明, 有些观点也存在较大争议. 本文就HRS的研究进展结合我们的研究成果综述如下.

1 HRS发病机制的两种学说

1.1 肝-肾直接相关 基于两种诱发肾血管收缩的机制, (1)肝源性的血管收缩因子的合成或释放的增加和血管舒张因子的减少, 导致肾血管收缩, 进而肾脏血流减少^[2]; (2)通过实验动物来判定肝脏通过肝-肾反射影响肾功能. 在实验动物中, 肝低压感受器接受刺激, 心肺和肾传入交感神经活性增高, 使颈内静脉瓣关闭; 肝脏去神经后, 增加的肾神经活性也被去除; 同样, 将谷氨酰胺注入正常大鼠的门脉系统, 能引起明显的GFR降低和尿量减少, 将迷走神经切除或肾神经切除, 这种作用消失, 根据这些发现认为HRS是由于肝硬化时肝肾反射持续激活的结果.

1.2 动脉舒张假说 这一假说认为, 全身动脉血管舒张, 引起全身循环包括肾低灌注. 应用肾动脉造影术、¹³³ 氙冲洗技术、双氨基马尿酸清除率和最近的双重多谱勒超声显像技术^[3], 发现在没有达到HRS诊断标准的肝硬化患者已经存在轻度或中度的肾血管收缩, 肾血管收缩主要在肾皮质, 说明在HRS发生前肾血管阻力已经增加, 所以, 如果肾血流进一步降低将增加HRS发生的危险性. 早期对肝硬化血液动力学的研究认为肾血管收缩同时并不存在与肾血流量相关的心输出量和血容量的降低, 后来, 许多研究肯定了HRS患者的血液动力学模式是高心输出量和全身血管阻力的降低, 肾血流减少是全身血液循环改变的反应. 按照这一理论, HRS是动脉循环低灌注恶性进展的结果, 进一步引起压力感受器介导的全身血管收缩因子(肾素-血管紧张素、交感神经、抗利尿激素和精氨酸血管加压素)活性增强, 导致肾循环和其他血管床的血管收缩(上、下肢末梢血管), 内脏可能由于血管扩张因子的作用而暂时逃避血管收缩因子的作用, 引起明显的血管持续扩张, 且与血管收缩因子的作用形成恶性循环, 最终因血管扩张因子的作用对抗不了血管收缩因子的作用而导致血管收缩和肾脏低灌注, 逐渐发展成HRS.

2 HRS的发病机制

低肾血流是HRS的标志. 大量的实验证明, HRS患者存在明显的肾血管收缩和体循环阻力血管舒张. HRS时

肾血管收缩和体循环阻力血管舒张的机制尚不清楚,可能是多因素综合作用的结果。

2.1 肾血管收缩因子

2.1.1 血管紧张素Ⅱ 在HRS中血管紧张素Ⅱ是对肾血管起主要收缩作用的因子^[4]。临床实验和实验性急慢性肾功衰竭的研究证实,血管紧张素Ⅱ对肾循环具有强有力的缩血管活性。但在急性实验性肾功能衰竭发生机制的研究中发现:血管紧张素Ⅱ具有增加入球小动脉交感神经活性的功能,由此引起实验动物肾血管收缩,肾血流减少,肾小球滤过率下降。血管紧张素Ⅱ在肾脏产生,作为局部血管收缩机制,血管紧张素Ⅱ可能通过肾素-血管紧张素系统参与肝硬化时肾血管收缩的发生。

2.1.2 AVP 精氨酸血管加压素(arginine vasopressin, AVP)或抗利尿激素在下丘脑视上核和室旁核合成,在肾循环具有血管收缩的活性,肝硬化合并腹水的患者血浆AVP水平增加,并与肾血浆流量(RBF)和GFR呈负相关,推测这些激素可能在HRS的发病机制中发挥作用。

2.1.3 内皮素 内皮素是由21个氨基酸组成的肽,他是引起肾血管和肾小球系膜细胞收缩的活性物质,尽管他与肾血管收缩的关系仍有争议,但在肝硬化时,其血浆水平明显增高,且增高的水平与肾功能衰竭的程度平行^[5]。Soper给3例HRS的患者快速投用内皮素受体BQ123拮抗剂,结果显示肾功能明显改善。肝硬化时血浆内皮素浓度增加的原因可能是由于在肝脏和内脏循环肽产生增加的结果,这时肾脏局部内皮素是否增加还不清楚。

2.1.4 腺苷 HRS中,腺苷是另外一种血管活性物质,在肺和肾引起血管收缩,而在其他器官导致血管舒张。腺苷可能增强血管紧张素Ⅱ的活力,因为腺苷产生增加与器官的低灌注有关,所以在HRS中,腺苷可能是一致肾血管收缩的因子^[6]。

2.1.5 内毒素 肝硬化患者的内毒素来自于肠道内异常增生的革兰阴性杆菌和并发腹水感染的细菌;肝功衰竭时,库氏细胞的功能减低,肝脏功能减退,对肠源性内毒素的屏障作用消失,或通过门脉高压后形成的门体侧枝循环,致使内毒素不经肝脏直接入血形成内毒素血症。有人观察给清醒大鼠注射内毒素,引起GFR和尿量明显减少,而血压没有降低。内毒素具有强烈的缩血管作用,使肾血管收缩、肾皮质缺血而引起肾血液动力学障碍,同时他能刺激多种缩血管物质如内皮素、白三烯等的合成和释放,导致肾血流量进一步减少。

2.1.6 其他 白三烯C₄和D₄、血栓素A₂(TXA₂)在肾缺血时产生,具有较强的血管收缩作用,并可使肾小球系膜细胞收缩。尽管HRS患者血液中白三烯的水平很低,可能对肾循环不起作用,但肾脏合成的白三烯可能参与了肾功能的调节^[7]。有资料表明,血栓素合成酶抑制剂抑制TXA₂的合成并不能改善肾功能,表明他在HRS发病机制中可能不是一个主要的血管收缩因子。

2.2 肾血管舒张因子

2.2.1 前列腺素 最重要的肾内血管扩张因子是花生四烯酸的代谢产物,特别是前列腺素(PGs)。他是肾内最重要的血管扩张因子,能够抵消因血管收缩因子水平的增高而影响肾功能。在正常生理条件下PGs没有或几乎没有调节肾血流的作用,因为在正常生理条件下投给健康人和实验动物非甾体类消炎药(NSAIDs,可抑制肾脏合成PGs)不能引起肾脏功能的变化。当盐缺乏、出血性低血容量、血管紧张素Ⅱ、肾脏神经系统活性增高和抗利尿激素水平升高使肾血管收缩,导致肾脏缺血时,抑制PG的合成能减少肾血流^[8]。所以PGs是一个能抵抗肾血管收缩因子的作用,保护肾脏功能,维持机体功能正常的因子。有学者认为,肝硬化腹水患者,虽然肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)和交感神经系统(SNS)的活性及其他血管收缩因子水平增高,但因肾脏合成PGs增多,肾灌注仍可维持正常,从而不发生肾功衰竭。而严重肝病合并HRS时,其RBF和GFR下降可能是肾血管收缩增强,肾PGs合成和释放不足所引起的。

2.2.2 一氧化氮 在肝硬化中维持肾脏血流的肾血管扩张的另一因子是一氧化氮(NO),但仅为实验室证据。在肝硬化并腹水的大鼠,NO的产生增加,而引起NO产生增加的主要原因则是iNOS的诱导激活^[9],用四氯化碳诱导的肝硬化腹水大鼠肾脏NOSⅢ蛋白表达增加,免疫组化证实他主要位于肾小动脉内皮细胞。由于肾脏PG合成的代偿性增加,投给肝硬化并腹水的大鼠NO合成抑制剂不能引起肾血管收缩。当NO和PG合成同时受到抑制时,出现肾血管的明显收缩,说明在肝硬化时,NO和PG相互作用共同维持肾血液动力学改变。

2.2.3 利钠肽 自1950年Kisch首先从豚鼠的心房细胞中发现了新型的体液调节激素-心房利钠肽(ANP)以来,有相继发现 α 、 β 、 γ 型ANP, BNP, CNP^[10],他们均具有排钠利尿、增加GFR和降低血压的作用, VNP较ANP具有更强的活性,但VNP尚未在人体中发现。应用选择性拮抗剂HS-142-1快速阻断促尿钠排泄多肽A和B受体引起广泛的肾血管扩张而对全身血液动力学无影响,说明在肝硬化时这些多肽参与维持肾灌注。

2.3 交感神经系统的活性 1980年以来,人们认识到肝肾神经反射在HRS发生中的作用,并证明HRS时患者的交感神经高度活跃,肾动脉和静脉的缩血管物质(尤其是去甲肾上腺素)与肾血浆流量呈负相关;而麻醉阻滞腰交感神经,使肾交感神经活性降低,可部分地逆转HRS患者的肾功能衰竭,表明交感神经系统作为重要的神经体液因素参与了HRS的发病。HRS时肾交感神经兴奋,去甲肾上腺素分泌增加是保钠储水,恢复血容量的一种代偿机制^[11]。然而,交感神经兴奋导致肾血流灌注减少和血流分布不均匀、不稳定,可能是HRS发生的病理基础。总之,在肝硬化时肾血管活性因子水平和

交感神经兴奋性是增加的,在调节肾血流中起重要作用。

3 肾血管收缩和舒张的调节

血管平滑肌的收缩和舒张调节机体各脏器的血流量。但目前HRS发生时肾血管收缩的机制还不十分清楚。随着细胞内第二信使传递机制的深入研究和信息传递及跨膜信息传递机制的阐明, HRS 发生机制研究的焦点也集中到了细胞内第二信使传递在肾皮质血流量减少方面作用的研究上。1, 4, 5-三磷酸肌醇(Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate, IP_3)是细胞间跨膜信息传递的一个第二信使, IP_3 通过和其受体结合激活细胞内储备 Ca^{2+} 库,使细胞内 Ca^{2+} 释放,以调节各种细胞的生物活性。血管平滑肌的收缩和舒张调节功能也是受 IP_3 和 IP_3Rs 介导的细胞内储备 Ca^{2+} 释放水平调节^[12]。急性肝功衰竭和肝硬化腹水患者的血浆内皮素和血管紧张素 II 等的血管收缩因子水平显著高于对照^[13]。这些血管活性物质可以通过由磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸磷酸化产生的 IP_3 来促进细胞内 Ca^{2+} 水平增高,使肾小球前小动脉平滑肌收缩,调节肾血管的收缩和舒张,从而影响肾血流。

最近,实验研究发现许多细胞因子不但影响免疫细胞的生物活性,而且对其他宿主细胞的生物行为也有影响。Sharma *et al*报告: $TGF\beta$ 对肾小球系膜细胞内的 I 型 IP_3 受体表达有抑制作用。Fas 抗原与 Fas 配体结合引起心肌细胞凋亡过程有可能是通过促进 IP_3 浓度增加促使细胞发生凋亡的^[14]。I 型和 III 型 IP_3R 表达参与心肌细胞凋亡的发生。TNF- α 是单核细胞产生的一种细胞因子,在感染性休克和重型肝炎、慢性肝炎和肝硬化的发病中起到重要的作用^[15-18],并在许多病理和病理生理过程中起着细胞间信息传递的重要作用。严重肝损伤患者体内 NO 产生增多,可能与 TNF- α 诱导平滑肌细胞内 NO 的合成有关^[19]。TNF- α 可以使 NF- κB 活化以传递各种信息进入细胞核内,诱导 NO 等物质产生。NO 被认为是肝硬化患者血管扩张的早期因子。在腹水形成早期,由于血管舒张因子合成或激活增加,肾血管维持正常或接近正常水平,但随着病情的进展,全身或肾脏血管舒张因子高度活化仍不能抵消血管收缩因子的作用。最近,我们发现 TNF- α 可以增加肾小球前小动脉平滑肌细胞(RASM)内 I 型 IP_3R 和 I 型 IP_3R mRNA 的表达^[20]。结果提示: TNF- α 诱导 IP_3R 过表达可能构成肾小球前小动脉平滑肌收缩的病理生理基础。

总之, HRS 的发生是综合性因素参与的结果,并非单一因素独立起作用,在具体的患者中,则可能某些因素占主导地位。

4 参考文献

- Bataller R, Gines P, Arroyo V, Rodes J. Hepatorenal syndrome. *Clin Liver Dis* 2002;4:487-507
- Jimenez-Saenz M, Soria IC, Bernardez JR, Gutierrez JM. Renal sodium retention in portal hypertension and hepatorenal reflex: from practice to science. *Hepatology* 2003;37:1494-1495
- Bardi A, Sapunar J, Oksenberg D, Ponichik J, Fernandez M, Paolinelli P, Orozco R, Biagini L. Intrarenal arterial doppler ultrasonography in cirrhotic patients with ascites, with and without hepatorenal syndrome. *Rev Med Chil* 2002;130:173-180
- Arroyo V. Reviewarticle: hepatorenal syndrome—how to assess response to treatment and nonpharmacological therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20 (Suppl 3):49-54
- Anand R, Harry D, Holt S, Milner P, Dashwood M, Goodier D, Jarmulowicz M, Moore K. Endothelin is an important determinant of renal function in a rat model of acute liver and renal failure. *Gut* 2002;50:111-117
- Ming Z, Smyth DD, Lauth WW. Decreases in portal flow trigger a hepatorenal reflex to inhibit renal sodium and water excretion in rats: role of adenosine. *Hepatology* 2002;35:167-175
- Farzaneh-Far R, Moore K. Cysteinyl-leukotrienes and the liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2003;72:35-50
- Capella GL. Anti-leukotriene drugs in the prevention and treatment of hepatorenal syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;68:263-265
- Turkay C, Yonem O, Arikian O, Baskin E. Nitric oxide and renal functions in liver cirrhosis. *Turk J Gastroenterol* 2004;15:73-76
- Gulberg V, Moller S, Henriksen JH, Gerbes AL. Increased renal production of C-type natriuretic peptide (CNP) in patients with cirrhosis and functional renal failure. *Gut* 2000;47:852-857
- Uriz J, Gines P, Ortega R, Jimenez W, Cardenas A, Calahorra B, Sort P, Fernandez J, Bataller R, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Increased plasma levels of neuropeptide Y in hepatorenal syndrome. *J Hepatol* 2002;36:349-355
- Vermassen E, Van Acker K, Annaert WG, Himpen B, Callewaert G, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB. Microtubule-dependent redistribution of the type-1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in A7r5 smooth muscle cells. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 7):1269-1277
- Yan Y, Zhang BL. Clinical study of renal blood flow and endothelin in cirrhotic patients. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2004;12:278-280
- Binah O, Shilkut M, Yaniv G, Larisch S. The Fas receptor-1,4,5- IP_3 cascade: a potential target for treating heart failure and arrhythmias. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1015:338-350
- 董满库, 崔彦, 陈昌玮, 周立艳, 刘子沛, 李晓鸥, 吉敏. 大鼠肝脏缺血再灌注损伤中 TNF- α 的变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:354-355
- Dong Y, Zhang HF, Chen H, Yang XJ, Li J, Shu CL, Cheng Y. The cytokine secretion of peripheral blood mononucleocytes from patients infected with HCV. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2004;20:331-333
- Wang JY, Wang XL, Liu P. Detection of serum TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-8 in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 1999;5:38-40
- 臧国庆, 俞红, 周霞秋, 廖丹, 谢青, 王斌. TNF- α 体外介导小鼠肝细胞凋亡和坏死. *世界华人消化杂志* 2000;8:303-306
- Nakamura M, Yoshida H, Arakawa N, Saitoh S, Satoh M, Hiramori K. Effects of tumor necrosis factor-alpha on basal and stimulated endothelium-dependent vasomotion in human resistance vessel. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:487-492
- 王静艳, 孙锦春, 吕斌, 刘沛. 肿瘤坏死因子- α 增强肾小球前小动脉平滑肌细胞内 I 型三磷酸肌醇受体的表达. *中华内科杂志* 2002;41:86-89

EUS引导下腹腔神经节阻断术治疗慢性胰腺疼痛

赵航, 李兆申

赵航, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化科
上海市 200433

项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科、全军消化内科专科中心、全军消化病研究重点实验室、第二军医大学胰腺疾病研究所。zsl@online.sh.cn
收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-04

摘要

本文对腹腔神经节阻断术(celiac plexus block, CPB)结合超声内镜(endoscopy ultrasound, EUS)技术缓解慢性胰腺炎及胰腺肿瘤引起的疼痛作一综述。

赵航, 李兆申. EUS引导下腹腔神经节阻断术治疗慢性胰腺疼痛. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2671-2673

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2671.asp>

0 引言

腹腔神经节阻断术(celiac plexus block, CPB)利用穿刺技术, 根据腹腔神经节解剖定位, 穿刺后行药物注射, 破坏或暂时阻滞痛觉神经传入, 达到止痛作用。其穿刺操作可借助于 B 超、CT 等影像检查手段, 主要应用于腹腔晚期肿瘤及慢性胰腺炎等疾病引起的顽固性腹痛。超声内镜(endoscopy ultrasound, EUS)结合超声和内镜技术, 应用于 CPB 后, 使操作更加简便、安全。

1 胰性疼痛的发生及 CPB 止痛机制

80-85%胰腺癌患者疼痛显著, 需要治疗, 其中 44% 为重度疼痛^[1]。胰腺癌患者疼痛原因多方面, 阻塞胰管扩张可引起痉挛性疼痛, 炎症反应, 组织间隙压力增高, 缺血, 肿瘤直接侵犯神经或引起牵拉均为疼痛原因^[2]。同时胰腺分泌的神经破坏酶促进了肿瘤向神经组织侵犯, 肿瘤周围炎症反应可使神经末梢敏感性增高。胰腺癌胰腺外侵犯常见, 34 例行胰腺切除患者, 29 例切除组织见胰后神经节侵犯。疼痛亦可由于临近器官受侵造成, 如十二指肠, 肝, 胃, 空肠, 横结肠等。胰腺本身为交感、副交感神经纤维网络包绕, 疼痛感觉可为多点或位于远处, 胰体部肿瘤常表现为胃部不适, 胰尾部肿瘤则表现为左上腹或左季肋部不适, 疼痛可以放射至躯体其他部位, 如肩部、颈部。许多患者须不间断服用鸦片类镇痛药物, 严重者每小时均需服药, 随疾病发展, 疼痛加剧, 药物需求增加。持续服用该类药物可引起呼吸抑制、抑郁、恶心、嗜睡、便秘等副作用^[1-3]。

胰性疼痛主要由腹腔神经传导。腹腔神经丛由左右腹腔神经节在腹腔干水平包绕大动脉形成, 神经节位于膈脚和第一腰椎后, 肾、肾上腺及下腔静脉旁, 胰腺前。大多数患者, 位于腹腔干和肠系膜上动脉之间, 左侧神经节稍低。神经节平均大小 3.1 cm × 3.2 cm × 3.5 cm。神经节主要包括交感纤维, 也包括副交感纤维, 在 T₅ 到 T₁₂ 水平接受内脏神经传入冲动, 包括来自胰腺的所有上腹脏器的传入神经纤维进入神经节, 然后上行至 T₅ 至 T₁₂ 节段背根神经节换元, 然后沿脊髓上行至大脑皮层。

腹腔神经节阻断术常用于晚期恶性肿瘤引起的疼痛治疗, 通常选择穿刺注入无水乙醇, 引起神经节组织永久破坏, 或注入皮质类固醇, 引起暂时性神经传导阻滞。前者多用于肿瘤等恶性疾病, 后者多用于慢性胰腺炎等良性疾病。

2 操作方法

1914 年 Kappis 行第 1 例 CPB, 此后, 由于无断层影像技术, 穿刺仅根据其在脊柱前方解剖位置定位, 多年来, 操作一直由放射科医师和麻醉医师凭经验用长针完成。最常用进针路径为后路法, 用 15-20 cm 在第一腰椎后外侧沿椎体进针, 这样针尖刚好位于椎体前方, 其他方法包括横贯进针及经主动脉技术。一般, 穿刺和注射双侧进行。后路法的潜在危险性在于, 可能发生神经系统并发症, 可能由于误穿硬脊膜或主动脉椎体分支造成, 引起直接损伤或缺血^[4]。后来, 在超声或 CT 引导下, 行前路经皮穿刺, 这些方法更快速, 并且避免了神经系统并发症发生的危险性, 但存在刺入肠腔或实质脏器的危险性。

穿刺时患者取左侧卧位, 于清醒镇静和无创监测下行操作过程。为减少低血压危险, 术前予患者输注 500-1 000 mL 生理盐水。内镜通过胃食管交界后, 操作者令线阵型 EUS 内镜面向患者头, 在胃体小弯侧后壁可得到主动脉纵切面图像, 沿主动脉向足侧, 找到第一个大血管分支, 腹腔动脉, 凭借彩色多普勒, 避免刺入血管。通常用 22 号穿刺抽吸针, 先用生理盐水湿润后插入活检通道, 固定好轴芯, 然后在超声内镜指导下穿刺至主动脉附近, 在其纵切面的前方、腹腔干水平, 针芯内充入 3 mL 生理盐水以去除穿刺过程中进入针芯的组织。每次注射药物之前都要回抽以排除穿入血管^[5]。

通过实时超声, 针刺入位点, 常位于腹腔动脉分支前方头侧 1 cm 处。少量生理盐水冲洗, 然后抽吸 10 s,

在胰腺癌患者中进行的CPB,先注射2.5 g/L布比卡因10 mL,随后注射10 mL无水乙醇.无水乙醇可产生回声光团.尽管应用镇静剂,注射后仍可产生不适.退出穿刺针前,针芯内充入3 mL生理盐水以防止针道中乙醇溢出.然后在主动脉对侧同样操作.有时因肿大淋巴结和/或肿瘤导致结构变异,则只能注射单侧.操作完毕后再监测2 h生命体征.出院前测量立位、卧位血压,CPB可门诊施行,一般无需住院.

对慢性胰腺炎患者实施的CPB,有作者使用类固醇(曲安西龙悬液单侧40 mg,双侧80 mg)替代无水乙醇.除类固醇外,还有研究者加用少量乙醇(单侧4 mL,双侧8 mL),尽管在良性疾病这种用法是有争议的.乙醇具有杀菌效果,如不与类固醇合用,则建议给予广谱抗生素,尤其是在患者接受抑酸治疗时.

CPB最严重的并发症为神经事件,包括极度虚弱,麻痹,全脊麻醉及穿刺入脊髓.这些并发症发生率<1%^[6],另外与后路法有关的1%并发症包括气胸,乳糜胸,肩部或胸部疼痛,膈逆或血尿(由于穿入横膈或肾脏引起)^[7].其他少见但严重的并发症(2.5%),包括血管损伤和后腹膜出血、胰周脓肿.常见并发症多轻微,经皮穿刺最常见为疼痛(96%),短暂低血压(38%),短暂腹泻(44%)^[8].其他罕见的尚有各种胃肠动力障碍,如慢性腹泻、胃轻瘫^[9].目前尚无死亡报道.

3 疗效

3.1 胰腺癌 尽管疼痛患者口服药物为首选治疗方法,但有时口服大剂量麻醉药物尚不足以止痛,且药物副作用影响生活质量^[10].对于无法行姑息切除治疗患者,可供选择的止痛治疗有放疗,外科CPB,非外科CPB.1995年一项meta分析1145例癌性疼痛患者(63%为胰腺癌),显示90%CPB治疗后部分或全部缓解,缓解患者中70-90%止痛效果持续至死亡,部分超过3 mo^[11].一项随机双盲研究比较CPB与单纯药物注射止痛效果,药物治疗组接受实验剂量布比卡因,但无神经破坏药物,显示胰腺癌患者CPB比单纯药物治疗组疼痛缓解明显^[12].另一项研究比较CPB与非甾体抗炎药(NSAID)或吗啡对于胰腺癌疼痛评分、麻醉药物用量、生活质量的影响.结果显示CPB组短期内疼痛评分及麻醉药物用量明显减少^[13],然而生活质量提高并不明显,尽管生活质量恶化的趋势有所减慢.然而,最近Wong *et al*^[10]随机比较CPB及镇痛药对于胰腺癌止痛效果,100例患者随访1 a以上或至死亡为止.结果显示尽管早期,CPB组疼痛缓解好于口服药物组,但随时间推移,两组止痛药物需求量无明显差别,且两组生活质量及生存期差别不显著.

患者选择可能为影响CPB疗效的主要因素.Rykowski *et al*^[14]选取50例患者比较肿瘤位置与CPB疗效的关系,发现胰头部肿瘤患者比胰体或胰尾肿瘤患者更易获得疼痛缓解,另外胰体部肿瘤患者更易获得较长的

疼痛缓解期及CPB后更长生存时间.值得说明的是,本研究中胰体或胰尾肿瘤患者比胰体肿瘤患者分期更靠后.另有研究证实,疼痛发生后即行CPB更易获得短期或长期疼痛缓解.该研究意义在于胰腺体尾部肿瘤早期往往无明显症状,发现时已为晚期,胰腺外神经可能已有侵犯,神经解剖结构改变,导致CPB难以准确到达位置,影响疗效,另外,胰腺外转移病灶亦可为疼痛原因.Gunaratnam *et al*^[15]发现,接受化疗患者疗效更好,另一项包括98例患者研究发现胰腺姑息性手术后放疗患者行CPB比单纯术中CPB疗效好^[16],提示阻止肿瘤扩散的治疗方法有助于CPB疗效.Wiersema *et al*^[17]在一项前瞻性研究中,对58例晚期胰腺癌的疼痛患者进行EUS-CPB,在腹腔干两侧注射的药物是3-6 mL布比卡因和10 mL乙醇.用标准化的11点可视模拟刻度评定疼痛分数.45例患者(78%)在EUS CPB后疼痛分数下降.2 wk后总疼痛分数明显降低($P<0.001$).多元分析显示,患者有24 wk的疼痛缓解,无需吗啡或辅助治疗.然而,接受化疗或放化疗有额外的好处.辅助治疗后疼痛缓解随时间延长而增加,24 wk时明显提高($P<0.002$).尽管疗程中阿片应用量增加,但无统计学意义.无严重并发症.轻微并发症多短暂,包括体位性低血压(20%),腹泻(17%)和疼痛加重(9%).这项研究提供的数据提示EUS-CPB的疗效和安全性,但病例数少、无对照、无双盲,结论的可信度受限.尽管45例(78%)患者疼痛分数下降,只有31例(54%)患者疼痛分数降低2点以上,2点以上被认为是止痛有效.EUS-CPB的疗效在8-12 wk时减弱,在此期间未接受辅助治疗的患者疼痛分数有上升趋势.Gunaratnam *et al*^[15]的2001前瞻性EUS-CPB治疗胰腺癌,78%患者疼痛缓解,结果同手术或经皮治疗效果相当,恶性疾病,注射时间可预知反应.CPB在疾病诊断早期应用好于病程晚期时应用.该结果据推测可能因为疾病晚期其他内脏或躯体神经参与疼痛反应.

3.2 慢性胰腺炎 CPB控制慢性胰腺炎疼痛的疗效尚未明确.多数研究结果并不令人满意.Gress *et al*^[18]首先观察了用EUS-CPB对18例药物或内镜治疗无反应的慢性胰腺炎患者止痛的疗效,随后病例扩大到90例^[19].患者每侧注射10 mL布比卡因和3 mL曲安西龙,定义疼痛减轻为疼痛评分下降大于3.研究的最初阶段,患者随机分成EUS-CPB和CT-CPB,疼痛分数下降,麻醉剂用量减少在EUS-CPB组为50%,CT-CPB为20%.与CT-CPB相比,EUS-CPB产生的止痛效果更长,在24 wk的观察期内,30%患者症状改善.在90例患者中,4 wk、8 wk随访时55%有明显的止痛效果.26%和10%的患者分别在12 wk、24 wk后仍有持续的止痛效果.年龄>45岁和未行胰腺手术者效果更好.3例患者出现轻微短暂的腹泻,1例在EUS-CPB 5 d后出现胰周脓肿,作者认为使用质子泵抑制剂后胃内细菌繁殖,导致透壁性种植,应用抗生素后脓肿痊愈.目前作者在

EUS-CPB 使用类固醇时常规预防应用抗生素. 在 12 例接受 EUS-CPB 与 CT-CPB 患者中, 2/3 认为 EUS-CPB 优于 CT-CPB. 然而, 由于该研究为非双盲, 缺少对照并且接受 CPB 治疗患者时间跨度过长, 使其可信度下降. EUS-CPB 与 CT-CPB 相比花费更少, 平均每个患者节省 200 美元. Wiersema *et al*^[17] 的研究发现, 胰腺癌患者行 EUS-CPB 后疼痛显著减退, 持续时间超过 12 mo. 接下来, 他们实验组的前瞻研究需服麻醉性镇痛药的慢性胰腺炎患者, 二者给药方式相同. 起初两组的疼痛评分相当, 16 wk 随访后, EUS-CPB 的慢性胰腺炎患者评分改善不明显, 而恶性疾病组, 评分下降. 估计疼痛控制时间为恶性 20 wk, 慢性胰腺炎 2 wk.

总之, EUS-CPB 对于早期胰腺肿瘤止痛效果好, 疼痛缓解率同手术治疗相当. 胰性疼痛中肿瘤性疼痛疗效好于慢性胰腺炎者. EUS-CPB 改善生活质量和延长生存期同口服药物相比差别不显著, EUS-CPB 对于慢性胰腺炎镇痛效果有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Fazel A, Draganov P. Interventional endoscopic ultrasound in pancreatic disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:104-110
- 2 House MG, Choti MA. Palliative therapy for pancreatic/biliary cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2004;13:491-503
- 3 Brescia FJ. Palliative care in pancreatic cancer. *Cancer Control* 2004;11:39-45
- 4 Hoffman BJ. EUS-guided celiac plexus block/neurolysis. *Gastrointest Endosc* 2002;56(4 Suppl):S26-28
- 5 Levy MJ, Wiersema MJ. EUS-guided celiac plexus neurolysis and celiac plexus block. *Gastrointest Endosc* 2003;57:923-930
- 6 叶晓芬, 金震东, 李兆申. 超声内镜引导下胰腺穿刺活检的现状. *世界华人消化杂志* 2001;9:333-335
- 7 Caraceni A, Portenoy RK. Pain management in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 1996;78(3 Suppl):639-653
- 8 Okuyama M, Shibata T, Morita T, Kitada M, Tukahara Y, Fukushima Y, Ikeda K, Fuzita J, Shimano T. A comparison of intraoperative celiac plexus block with pharmacological therapy as a treatment for pain of unresectable pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:372-375
- 9 刘枫, 金震东, 李兆申. 治疗性超声内镜对胰腺疾病的应用进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:1213-1215
- 10 Wong GY, Schroeder DR, Carns PE, Wilson JL, Martin DP, Kinney MO, Mantilla CB, Warner DO. Effect of neurolytic celiac plexus block on pain relief, quality of life, and survival in patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291:1092-1099
- 11 Schmulewitz N, Hawes R. EUS-guided celiac plexus neurolysis - technique and indication. *Endoscopy* 2003;35(Suppl 1): S49-S53
- 12 Polati E, Finco G, Gottin L, Bassi C, Pederzoli P, Ischia S. Prospective randomized double-blind trial of neurolytic coeliac plexus block in patients with pancreatic cancer. *Br J Surg* 1998;85:199-201
- 13 Kawamata M, Ishitani K, Ishikawa K, Sasaki H, Ota K, Omote K, Namiki A. Comparison between celiac plexus block and morphine treatment on quality of life in patients with pancreatic cancer pain. *Pain* 1996;64:597-602
- 14 Rykowski J, Hilgier M. Efficacy of neurolytic celiac plexus block in varying locations of pancreatic cancer: influence on pain relief. *Anesthesiology* 2000;92:347-354
- 15 Gunaratnam NT, Sarma AV, Norton ID, Wiersema MJ. A prospective study of EUS-guided celiac plexus neurolysis for pancreatic cancer pain. *Gastrointest Endosc* 2001;54:316-324
- 16 van Geenen RC, Keyzer-Dekker CM, van Tienhoven G, Obertop H, Gouma DJ. Pain management of patients with unresectable peripancreatic carcinoma. *World J Surg* 2002;26:715-720
- 17 Wiersema MJ, Wiersema LM. Endosonography-guided celiac plexus neurolysis. *Gastrointest Endosc* 1996;44:656-662
- 18 Gress F, Schmitt C, Sherman S, Ikenberry S, Lehman G. A prospective randomized comparison of endoscopic ultrasound-and computed tomography-guided celiac plexus block for managing chronic pancreatitis pain. *Am J Gastroenterol* 1999;94:900-905
- 19 Gress F, Schmitt C, Sherman S, Ciaccia D, Ikenberry S, Lehman G. Endoscopic ultrasound-guided celiac plexus block for managing abdominal pain associated with chronic pancreatitis: a prospective single center experience. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:409-416

基质金属蛋白酶与其抑制剂在消化道肿瘤中的研究进展

汪丽燕, 乔 镇, 关景明

汪丽燕, 乔镇, 关景明, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科
黑龙江省哈尔滨市 150086
黑龙江省科技厅攻关课题, No. GB01C12403
项目负责人: 关景明, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科.
电话: 0451-86605143
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-08-30

摘要

MMP和TIMP之间的相互平衡可以保证机体在生理状态下的细胞迁移和细胞外基质重构. MMP和TIMP之间平衡失调在细胞外基质降解这一过程中起决定性作用, 为肿瘤早期浸润的标志, 在肿瘤细胞侵袭和转移等病理过程中也发生作用. 基质金属蛋白酶MMP因其强烈恶性组织特性并具有独特的分解各种细胞外基质能力, 被确定是有希望的癌症治疗靶位. 由于认识到MMP在肿瘤侵袭及转移中起着重要的作用, 因此对MMP的抑制剂的研究也倍受重视, 这类抑制剂有可能成为广谱抗肿瘤治疗剂, 通过 MMPs, TIMPs 表达量的检测可以协助临床恶性肿瘤的早期诊断, 判断良性肿瘤, 特别是交界性肿瘤的转归, 从而指导临床预防抗肿瘤治疗. 通过研究MMP-TIMP之间及肿瘤与宿主细胞间的相互作用, 为临床恶性肿瘤的诊断, 预后判断及治疗提供理论及试验依据, 对临床实践具有一定的指导意义.

汪丽燕, 乔镇, 关景明. 基质金属蛋白酶与其抑制剂在消化道肿瘤中的研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2674-2678
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2674.asp>

0 引言

肿瘤之所以成为威胁人类主要疾病之一, 主要在于早期诊断和侵袭转移这两个问题尚未解决. 随着对肿瘤细胞基因、生物化学变化、肿瘤与宿主间复杂关系的深入研究, 发现肿瘤侵袭转移是一个多步骤的复杂过程, 涉及多种因素相互作用, 同时也发现了与肿瘤发生浸润以及转移有关的重要环节. 这些环节主要是: 血管生成环节、细胞外基质的退变、信号传导系统及调控、细胞凋亡过程. 细胞外基质的降解主要依靠蛋白水解酶即: 丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天门冬氨酸蛋白酶和基质金属蛋白酶, 其中基质金属蛋白酶几乎能降解细胞外基质的所有成分, 成为目前研究的热点.

1 MMPs 和 TIMPs

1.1 基质金属蛋白酶(MMPs) MMPs 是在 1962 年被发现的一组锌离子依赖性内肽酶, 是由 26 种 MMP 构成的

超家族^[1]. 各种 MMP 间具有一定的特性, 同一种 MMP 可降解多种细胞外基质成分, 而某一种细胞外基质成分又可被多种 MMP 降解. 不同细胞组织类型的细胞外基质成分的降解所需的 MMP 类型不同. 根据 MMP 作用的底物不同, 可将其分为 5 类: (1) 胶原酶(collagenases): 包括间质胶原酶(MMP-1)、多形核胶原酶(MMP-8)、胶原酶 3(MMP-13). 他们的主要水解底物是纤维类胶原, 即 I, II, III 型胶原; (2) 明胶酶(gelatinases): 包括明胶酶 A(MMP-2)、明胶酶 B(MMP-9). 他们的主要水解底物是变性胶原及细胞外基质(BM)的主要成分 IV 型胶原和 V 型胶原等. MMP-2 可以分解糖蛋白成分 FN 和 LN, 而 MMP-9 则不能; (3) 间质溶素(stromelysins): 包括间质溶素 1(MMP-3)、间质溶素 2(MMP-10)、间质溶素 3(MMP-11). 他们的水解底物比较广泛. 如 III、IV、V 型胶原、明胶、蛋白聚糖以及糖蛋白等; (4) 膜型基质金属蛋白酶(membrane type MMP, MT-MMP): (1) 膜型基质蛋白酶(MMP-14)、(2) 膜型基质金属蛋白酶(MMP-15)、(3) 膜型基质金属蛋白酶(MMP-16)、(4) 膜型基质金属蛋白酶(MMP-17). 目前已发现 MMP-14 和 MMP-16 可以激活 MMP-2; (5) 其他 MMP: 基质溶素(MMP-7)、金属弹力蛋白酶(MMP-12)、酸性金属蛋白酶(MMP-6)、端肽酶(MMP-4)、Enamelysin(MMP-20)、PASI(MMP-18/19). 其中 MMP-7 的水解底物也较广泛如: 蛋白聚糖、明胶、IV 型胶原等. MMP 家族成员即可以清除胶原分子、明胶分子等一些生物大子, 同时也可以降解胶原蛋白多糖, 为新细胞的生长提供空间. 正常生理条件下 MMP 的作用主要是降解细胞外基质, 促进新生血管形成, 调节细胞黏附而参与胎儿形成, 排卵, 创伤愈合. 但如果他们过度表达和激活则与癌症、风湿性关节炎、肺气肿、动脉粥样硬化、角膜溃疡、牙周炎等多种疾病相关. MMPs 家族成员在结构上有 40-50% 的同源性, 至少都会有信号肽、前肽、催化区 3 个结构域: 酶催化区和前肽区具有高度保守性, 在前肽区和催化区间都含有一个 PXKR 序列, 其活性依赖于锌离子的存在, 钙离子对其活化及稳定性起一定性作用; 激活后的酶至少可以裂解一种细胞外基质成分; 激活过程中约有 10 ku 的分子质量丢失; 酶的活性可以被基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)及 α_2 -巨球蛋白抑制剂抑制, 也可以被络合剂 EDTA 和 1, 10-Phenythrolin 所抑制; 间质胶原酶, 明胶酶以水溶性酶原形式分泌到胞外, 需要在激活剂作用下才具有酶活性, 膜型基质金属蛋白酶结合于胞膜上, 间质溶素直接以活性酶形式分泌到胞外.

MMPs在体内的表达、激活以及对底物的分解过程都受到严格的调控. 这种调控可以通过以下几个水平实现: 转录水平的基因表达调控; 转录后 mRNA 稳定性、蛋白质的翻译与酶原分泌的调控; 酶原激活的调控以及激活后抑制剂对其活性的调控. 许多生长因子和细胞因子等活性递质是酶原合成阶段最主要的调节因素, 他们不仅能促进或抑制 MMPsmRNA 的转录, 而且能影响其半衰期. 如表皮生长因子-1、血小板衍生生物生长因子、成纤维生长因子、白介素. 肿瘤坏死因子可以刺激体外培养的内膜间质细胞分泌 MMP 增加, 也可诱导 MMP 的表达; 糖皮质激素、肝素、孕酮维甲酸可以抑制 MMPsmRNA 的表达. 对 MMPs 的研究方法很多, 一般能检测蛋白质和核酸的方法都能用于 MMPs 的检测, 蛋白质印记和核酸印记法能够对 MMP 进行定量分析; 免疫组织化学和原位分子杂交能进行组织定位; 明胶酶谱法能测定酶的活性形式与酶原形式的比率; PT-PCR 能够提高检测的敏感性.

1.2 基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs) TIMPs 是 MMPs 的天然抑制剂, 是由体内细胞分泌的、能抑制 MMPs 活性的一类蛋白酶抑制剂, 可与 MMPs 的酶原与活化形式相结合. TIMPs 在肿瘤组织细胞与间质细胞中均可表达. 目前已知 TIMPs 主要有 4 种: TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 和 TIMP-4. TIMP-1 是一个由 184 个氨基酸组成的糖蛋白, 分子质量为 28.5 ku, 可与活化的 MMP 形成复合物, 降低细胞外基质的降解, 抑制肿瘤转移. TIMP-2 是一个非糖化的由 194 个氨基酸组成的蛋白质, 分子质量为 21 ku, TIMP-2 抑制 MMP-2 的活性, 对除 MMP-3、MMP-9 以外的 MMP 家族其他成员的活性也有抑制作用, 能阻断所有被激活的 MMP 的水解酶活性. TIMP1 和 TIMP2 都含有 12 个半胱氨酸, 他们靠二硫键两两结合而形成大小不等的 6 个环, 其中在氨基端构成 3 个比较大的环, 在羧基端构成比较小的环, 氨基端的 3 个大环可以与 MMP 催化结构域相互作用而起抑制作用. TIMP-3 是分子质量为 21 ku 的蛋白质, 可与细胞外基质结合, 为非可溶性蛋白质. 包括 TIMP-4 在内的所有 TIMP 均可与激活后的 MMP 以 1:1 比例结合而抑制其活性. TIMP 的 N-端通过两种不同反应模式与质膜结合: 一种是对 MMP 的异羟肟酸酯(HXN)抑制剂敏感, 另一种是对 MMP 的异羟肟酸酯(HXN)抑制剂不敏感的 TIMP 抑制剂. TIMP 抑制 65 ku 的 MMP-2 是通过他们的 N-端相互反应引起的, 结果 MMP-2-TIMP-2 络合物从膜上被释放出来, 65 ku 的 MMP-2 的活性被 TIMP-2 所阻断. 细胞周围 MMP-2 的活性与 TIMP-2 及细胞外周的基质成分密切相关, 但 TIMP-2 不能抑制 MMP-3, MMP-9 以及羧基端的 45 ku 的 MMP-2. TIMP-1 和 TIMP-2 能与 MMP-9 以及 MMP-2 的酶原通过每个分子的羧基端形成一种分泌络合物, 从而抑制其活性. TIMP 除了能抑制已激活的 MMP 的活性外, 还能阻止或延缓酶原型 MMP 转变为激活型 MMP 的过程.

TIMPs 的主要功能是抑制 MMP 的活性; 阻碍 MMP 介导的内皮细胞移动; 抑制基质中促血管生成因子的释放, 抑制新生血管生成; 防止细胞外基质降解.

2 基质金属蛋白酶(MMPs)与消化道肿瘤的关系

机体的正常细胞在不同致癌基因的长期作用下, 首先表现为细胞数量的增加, 但细胞形态尚未发生改变, 以后数量增加的同时细胞形态与起源细胞的细胞形态差异逐渐增加, 细胞从单纯到异常增生而具有恶变倾向. 恶性肿瘤的发展是一个逐渐的过程, 在发展到癌的过程中往往有一段属于癌前病变的时期, 即某些具有潜在癌变可能性的良性病变. 癌前病变是恶性肿瘤发生前的一个特殊阶段, 从理论上讲, 所有恶性肿瘤都有癌前病变, 但实际上许多恶性肿瘤的癌前病变阶段难以被目前检查所发现. 临床上常见的癌前病变有: 黏膜白斑、萎缩性胃炎、宫颈糜烂、乳腺囊性增生、老年日光性角化病、色素性干皮病、胃肠道息肉和某些良性肿瘤. Heslin *et al*^[2]在研究结直肠癌的形成过程中 MMP 的作用时发现, 腺瘤中 MMP-7 的基因表达为正常黏膜的 50 倍, MMP-2/MMP-9 在腺瘤中表达较正常黏膜无增强, 且 MMP 的表达与腺瘤的大小、异型增生及分级无关. 分析 MMP-7 可能是腺瘤向腺癌转变途径中的早期事件, 其他 MMP 及其抑制剂在一些恶性肿瘤的癌前病变中尚无报道. 癌前病变本身可以长期相对稳定, 停止发展, 甚至可以恢复正常, 仅有一小部分由于癌前基因突变逐渐积累最终发展成为恶性肿瘤. 因此认识癌前病变, 积极发现和治疗癌前病变就可以防止癌变, 预防癌症发生. 研究证实 MMPs 及 TIMPs 在体外(动物模型)及体内的表达与肿瘤侵袭和转移存在相关性, 并与某些肿瘤细胞分化程度、病理变化及临床预后相关. MMP-TIMP 的调节失衡或部分调节失衡在恶性肿瘤侵袭和转移过程中起决定性作用. 与胃肠道肿瘤侵袭和转移的基质金属蛋白酶主要是 MMP-2, MMP-9.

2.1 食管癌 MMP, TIMP 的活性与表达异常与食管癌的早期发生^[3]及晚期侵袭、转移密切相关^[4-5]. Sato *et al*^[6]在食管癌组织中癌细胞、组织巨噬细胞和成纤维细胞内检测到 MMP-9 蛋白、食管癌组织中 MMP-9 的表达显著高于癌旁组织^[7], 食管癌中 MMP-9 的表达增高与活性增强其预后差^[8]. Ohashi *et al*^[9]在对食管鳞癌的研究中认为, 高恶性度、高淋巴结转移者 MMP-9 阳性表达率高, MMP-9 高表达者食管鳞癌细胞的浸润性和转移性均增高, 5 a 存活率低. MMP-2 蛋白在食管癌组织中表现出与 MMP-9 蛋白相近的分布特征, MMP-2 主要表达在癌细胞胞质中, MMP-9 主要表达在癌巢周边的基质中, 部分癌细胞胞质中亦可见 MMP-9 的阳性表达. 食管癌细胞及其附近间质细胞均能分泌 MMP-2, 瘤细胞可以通过可溶性递质或黏膜和分子与间质细胞进行信息交换, 协助产生和调节 MMP, 这在肿瘤细胞侵袭和转移机制中可能具有重要意义, 这也符合肿瘤细

胞侵袭、转移、脱落并向远处转移的规律. 癌细胞和基质细胞同时表达 MMP-9 或 MMP-2 的病例占绝大多数, 这说明 MMP-9 和 MMP-2 在食管癌等肿瘤中作用是较复杂的. 食管癌等肿瘤组织中的恶性细胞进行浸润靠肿瘤细胞自身分泌 MMP 可能是不够的, 肿瘤细胞可能通过一系列信号传导机制诱导基质细胞表达 MMP 使其成为肿瘤细胞的浸润与转移提供条件. MMP-2 有激活 MMP-9 的功能, 而 MMP-9 可能在肿瘤晚期的浸润和转移中有诱导肿瘤血管发生的作用^[10]. MMP-2 的表达与肿瘤转移和较差的预后密切相关. MMP-2 在有外膜浸润的食管癌中阳性表达率显著高于无外膜浸润的食管癌 ($P < 0.05$), 有淋巴结转移的食管癌显著高于无淋巴结转移的食管癌 ($P < 0.05$), 这说明 MMP-2 在食管癌浸润和转移过程中发挥重要作用, 过量的 MMP-2 表达与食管癌的腺管浸润及淋巴结转移有密切关系. MMP-2 和 MMP-9 的表达是评价食管癌生物学恶性度的一个有用指标, 有望成为一种新的肿瘤生物学行为标志物.

2.2 胃癌 肿瘤细胞黏附、分泌蛋白酶降解细胞外基质和移动是肿瘤浸润和转移的三个关键步骤. 胃癌的浸润和转移是造成人死亡的主要原因. Westermarck *et al*^[11]认为, 肿瘤细胞可能通过一系列信号传导机制诱导基质细胞分泌 MMP 利于肿瘤细胞的浸润转移. *H. pylori* 感染可能促使转移正相关因子 MMP-2、MMP-3 表达增高, 转移负相关因子 TIMP-2 蛋白表达降低, 而在胃癌转移过程中发挥重要作用^[12]. MMP-7 在胃癌中表达上调, 可作为揭示生物学行为的客观指标, 其可能通过参与胃癌的生长、浸润、转移和血管形成而在胃癌的发生和演进中起到重要作用^[13]. 血管生成在胃癌发生早期即已启动, 随着病变损害向进展期发展而愈加明显, 与胃癌的发生发展关系密切^[14]. MMP-2 和 MMP-9 不仅在胃癌癌细胞中表达, 而且基质中的纤维母细胞和单核吞噬细胞中也有表达^[15]. 人胃癌组织中 MMP-2, MMP-9 基因在 mRNA 和蛋白质水平均较胃癌旁组织阳性率高, 而且主要在实质细胞胞质, 分布于癌巢周边, 呈片状或灶状分布, 肿瘤侵袭前缘其 MMP 阳性表达率明显高于肿瘤实质核心, 而癌旁阳性表达主要在间质细胞, 而且表达率低, 表明 MMP2、MMP9 基因激活是人胃癌癌变过程中的重要因素, 而且在癌变过程中始终存在^[16]. 在 Monig *et al*^[17]的研究中显示胃癌组织中 MMP-2 的表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 UICC 密切相关而与肿瘤分化程度、WHO, LAUREN, GOSERI, MING 分型无关, 胃癌组织中 MMP-2 的表达与 LAUREN, WHO 分型, TNM 分期无关. MMP-2 与早期淋巴结转移密切相关, MMP-2 可以作为预测胃癌淋巴结转移的独立指标. Kabashima *et al*^[18]研究发现胃癌组织中存在 MMP-9 的高表达, 而正常胃黏膜组织及癌旁组织中未见或少见 MMP-9 mRNA 的表达, 提示 MMP-9 可作为区别肿瘤良恶性的一项指标^[19]. 胃癌浸润至肌层者 MMP-9 阳性表达率明显高于胃癌仅限于

黏膜及黏膜下层者 ($P < 0.05$); 伴有淋巴结转移的胃癌其 MMP9 表达率明显高于无淋巴结转移者; 随着淋巴结转移站次的提高和 TNM 分期的进展, MMP-9 阳性表达率逐渐增加, 呈正相关; MMP-9 mRNA 与胃癌临床分期有直接关系, 随临床分期上升而呈上调表达; 癌细胞分泌 MMP-9 引起基质膜的降解, 促使癌细胞渗入毛细淋巴管, 说明 MMP-9 mRNA 的过度表达与胃癌转移的发生有关, MMP-9 mRNA 水平高低与胃癌患者的生存期成负相关; MMP-9 高水平表达的胃癌患者术后生存率普遍较低, 无论临床分期如何, MMP-9 表达水平高者预后差具有转移力的肿瘤细胞分泌大量的 MMP9, 不仅在原发部位浸润, 还可浸出血管壁, 为完成转移创造了条件. 因此 MMP-9 作为一项判断胃癌预后的指标, 对术后需辅助化疗的患者提供了有价值的依据. Shen *et al*^[20]研究证实, 术前血清 MMP9 高水平的胃癌患者预后差, 因此术前检测血清 MMP 水平, 可预测肿瘤的浸润程度、淋巴结是否发生转移, 从而为制定合理的手术方案提供有效的信息, 血清 MMP9 水平可作为判定术后肿瘤是否复发的有用指标.

2.3 大肠癌 在研究 MMP2 组织抑制剂 TIMP 对高转移性人黑色素系 M24net 生长和扩散的影响中发现: TIMP-2 cDNA 的表达载体转染以后, M24net 细胞系的转移潜能都显著下降, 进一步证明了 MMP-2 与肿瘤转移之间存在密切关系. MMP-2 除了可以表达于肿瘤实质中外, 还可以表达于肿瘤间质中. 结肠腺癌中 MMP-2 在嗜酸性粒细胞呈中等水平表达, 在成纤维细胞及血管内皮细胞等间质细胞中也有表达; 相反在肿瘤邻近的非肿瘤黏膜中则未发现胶原酶的表达; MMP-2 阳性的癌细胞呈灶状或片状分布, 且多位于癌缘或管腔近旁, 提示具有转移潜能的癌细胞多位于肿瘤结节的表面或周边. 结肠肿瘤中 MMP-2 在肿瘤间质的表达水平较肿瘤实质高, 提示若肿瘤间质 MMP-2 呈阳性表达, 则肿瘤间质可与肿瘤实质协同作用降解基质, 促进肿瘤发生转移. MMP-2 的表达异常与肿瘤组织的侵袭性、分化类型、淋巴结转移和远处转移呈正相关. MMP-2 在大肠癌中的表达随 Dukes 分期增高而增加, 在伴有远处转移的组织中达到最高; 在大肠癌的进展和分化过程中, 分化程度越低, 肿瘤细胞分泌 MMP-2 越多, 其浸润和转移能力也越强. MMP-2 可作为预后判断的一个重要指标. Bodey *et al*^[21]的研究发现 MMP-9 的表达较强部位在癌巢的周边区域以及侵袭最活跃的位置, 说明其参与肿瘤向外侵袭扩展的过程. MMP9 与肿瘤细胞侵袭深度、分化程度、有无淋巴结转移及 Dukes 分期密切相关, 但与性别、年龄及组织学类型无关. MMP9 在大肠癌组织中的表达率显著高于良性肿瘤组和正常对照组, 同一肿瘤组织中, 部分癌细胞 MMP9 呈强阳性表达, 而部分癌细胞呈弱阳性表达, 说明了癌细胞的异质性. MMP9 参与大肠癌的恶性进展, 其在大肠上及恶性转化过程中表达率增高, 表达强度增强, 在大肠癌

进展中发挥重要作用. MMP-9 mRNA水平可作为预测大肠癌无瘤生存及总生存期的独立指标, MMP9可作为判断结肠癌预后的指标^[22]. Parsons *et al*^[23]认为结直肠癌和胃癌中MMP-2和MMP-9较相应正常组织中的含量和活性均明显增加, 且与肿瘤侵袭转移相关. Zeng *et al*^[24]认为随着MMP-2和MMP-9蛋白活性形式表达增强, 基膜中IV型胶原降解是结直肠癌进展的重要因素之一, 对MMP的抑制有利于控制结肠癌的进展. 血浆中MMP-2和MMP-9的表达水平有可能成为结肠癌侵袭及转移的一个独立指标^[25].

恶性肿瘤的主要生物学特性是浸润和转移. MMP在肿瘤中通过3个环节导致癌细胞的增长及扩散: (1)MMP分解健康组织的基质结构使肿瘤增生, 引起发病. (2)MMP使组织结构松弛, 以使癌细胞转移, 组织的自我分解也促使MMP的释放, 从而引起进一步的肿瘤增生, 引起转移. (3)在细胞外基质降解的同时, MMP有助于为新的血管生长提供空间, 引起血管生成是肿瘤进展的重要原因之一, 对MMP的抑制有利于控制肿瘤的进展.

3 金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)与消化道肿瘤的关系

转染TIMP基因的肿瘤细胞其恶性转移的生物学表型得到下调. TIMP1可能具有基质金属蛋白酶抑制剂活性和生长因子活性, 在食管癌的发展过程中以基质金属蛋白酶抑制剂活性占优势, 抑制MMP9对细胞外基质和基底膜的降解, 从而抑制肿瘤的浸润和转移, 基质金属蛋白酶抑制剂对食管鳞癌的浸润和转移呈负性调节关系^[26]. 完整的人TIMP-1 cDNA转染人胃癌细胞系, 可降低其裸巢体内的成瘤性. 胃癌组织中TIMP-1阳性表达与胃癌浸润深度、淋巴结转移及TNM分期相关, 且TIMP-1阳性表达者术后的生存率高于阴性表达者; MMP9阳性表达而TIMP-1阴性表达者发生浆膜浸润及淋巴结转移的比率最高, 预后最差; TIMP1阳性而MMP9阴性者发生浆膜浸润及淋巴结转移的比率最低, 预后最好. MMP9-TIMP1表达失衡的情况可作为术前预测患者淋巴结转移的有效指标; 胃癌组织TIMP-1的表达情况可作为判断患者预后的指标. 胃黏膜内癌TIMP-2表达阳性率明显高于进展期胃癌, 而MMP-2表达阳性率低于进展期胃癌, MMP-2高表达及TIMP-2低表达预示胃癌的高恶性度和高转移潜能. 大肠癌组织中MMP-2和TIMP-2的表达呈负性关系, TIMP-2的表达与其分化程度及Dukes分期均无关. TIMP-1水平增高与大肠癌高D分期及5 a生存率降低相关.

4 MMPs及TIMPs表达失衡的临床意义

MMPs和TIMPs之间的相互平衡可以保证机体在生理状态下的细胞迁移和细胞外基质重构. MMP和TIMP之间平衡失调在细胞外基质降解这一过程中起决定性作用, 为肿瘤早期浸润的标志, 在肿瘤细胞侵袭和转移

等病理过程中也发生作用. 基质金属蛋白酶MMP因其强烈恶性组织特性并具有独特的分解各种细胞外基质能力, 被确定是有希望的癌症治疗靶位. 由于认识到MMP在肿瘤侵袭与转移中起着重要的作用, 因此对MMP的抑制剂的研究也倍受重视. 基质金属蛋白酶抑制剂TIMP可抑制肿瘤血管生长, 阻止肿瘤生长与转移, 这类抑制剂有可能成为广谱抗肿瘤治疗剂. 通过MMPs、TIMPs表达量的检测可以协助临床恶性肿瘤的早期诊断、判断良性肿瘤, 特别是交界性肿瘤的转归, 从而指导临床预防抗肿瘤治疗. 通过揭示MMP在肿瘤细胞侵袭转移过程中的重要作用及调控机制来寻找有效的抗TIMP, 抗肿瘤侵袭转移的抑制因子及阻断方法; 通过基因转染及反义cDNA技术, 增强抑制因子TIMP中的活性或阻断MMP活性, 获得明显抑制肿瘤细胞侵袭转移的效果; 通过研究MMP-TIMP之间及肿瘤与宿主细胞间的相互作用, 为临床恶性肿瘤的诊断, 预后判断及治疗提供理论及试验依据, 对临床实践具有一定的指导意义.

针对MMP的肿瘤治疗措施已经取得较大进展, MMP抑制剂具有细胞稳定剂的作用, 同传统的细胞毒性物联合使用, 可以更加有效的杀死瘤细胞, 防止单独使用细胞毒性药物易引起耐药和反弹现象. 目前有4个MMP抑制剂处于研究开发的三期经验阶段, 包括Marimastat、Batimastat、Endostatin、Angiostatin. 已进入临床应用的是Marimastat和Batimastat. Marimastat(BB-2516)为第一个进入临床的MMP抑制剂. 6组包括直肠癌、卵巢癌及前列腺癌的二期临床研究显示, 其抑瘤率为58%. 另一组二期临床实验结果显示, BB-25165与细胞毒素化疗药物联用对胰腺癌及胃癌有效. Batimastat(BB-94)为合成的广谱MMPI, 能阻止内皮细胞通过基底膜但可溶性差, 只用于治疗恶性胸腹水. 可以相信, 伴随MMP研究的不断深入, 人们在肿瘤生物分子和肿瘤治疗方面, 都将取得更大进步.

尽管TIMP对临床实验有一定的疗效, 但MMP抑制剂是抑制细胞而不是杀死细胞, 而参与研究的患者都是患有晚期癌症, 有些临床资料显示在一定场合下MMP抑制剂能刺激病情进展. 通过对TIMP用于临床实验的研究显示, 对未来TIMP的研究应考虑到: 实验的设计与结果, 所研究的细胞的来源, 底物及不同肿瘤发展阶段的MMP的作用方式, 只有这样我们的临床实验才有可能有价值.

5 参考文献

- 1 Roeb E, Matern S. Matrix metalloproteinases and colorectal cancer. *Med Klin (Munich)* 2003;98:763-770
- 2 Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, Diasio RB, Urist MM. Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Surg* 2001;233:786-792
- 3 Samantaray S, Sharma R, Chattopadhyaya TK, Gupta SD, Ralhan R. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:37-44

- 4 Collins HM, Morris TM, Watson SA. Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer* 2001;84:1664-1670
- 5 Li L, Zhang S, Lin H, Lin JY. Relationship of expression unbalance of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase to invasiveness and metastasis in gastric carcinomas. *Aizheng* 2002;21:305-310
- 6 Sato F, Shimada Y, Watanabe G, Uchida S, Makino T, Imamura M. Expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin in the process of lymph node metastasis in oesophageal cancer. *Br J Cancer* 1999;80:1366-1372
- 7 Guo W, Ran Y, Wang G, Liu J, Yu L, Sun L, Yang Z. Expression and hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in esophageal carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Xue* 2002;24:44-47
- 8 Yamamoto H, Vinitketkumnuen A, Adachi Y, Taniguchi H, Hirata T, Miyamoto N, Noshio K, Imsumran A, Fujita M, Hosokawa M, Hinoda Y, Imai K. Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2004;25:2353-2360
- 9 Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, Nemori R. Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 2000;88:2201-2209
- 10 Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik H, Leco KJ, Johnston RN, Brasher PM, Sutherland G, Edwards DR. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer* 1999;79:1828-1835
- 11 Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999;13:781-792
- 12 Li XH, Zhang GY, Luo FJ, Xu MH, Li Q. Influence of expression of matrix metalloproteinase induced by *H pylori* infection in gastric cancer cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zhazhi* 2003;11:544-546
- 13 Sun JM, Zheng HC, Yang XF, Xin Y, Zhang YC. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-7 and clinicopathobiological behaviors of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zhazhi* 2003;11:1310-1313
- 14 Tao HQ, Zou SC, Wang RN, Lin YZ. Relationship between gastric carcinogenesis and angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zhazhi* 2003;11:43-46
- 15 Allgayer H, Babic R, Grutzner KU, Beyer BC, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer: analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:62-73
- 16 Wang L, Zhang LH, Li YL, Li YL, Liu Z. Expression of MMP-9 and MMP-9 mRNA in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis. *Zhonghua Yixue Zhazhi* 2003;83:782-786
- 17 Monig SP, Baldus SE, Henneken JK, Spiecker DB, Grass G, Schneider PM, Thiele J, Dienes HP, Holscher AH. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology* 2001;39:597-602
- 18 Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Baba H, Koga T, Sugimachi K. Clinicopathological features and overexpression of matrix metalloproteinases in intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2000;6:3581-3584
- 19 Zhang S, Li L, Lin JY, Lin H. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:899-904
- 20 Shen KH, Chi CW, Lo SS, Kao HL, Lui WY, Wu CW. Serum matrix metalloproteinase-9 level associated with stromal reactin in patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 2000;20:1307-1310
- 21 Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Prognostic significance of matrix metalloproteinase expression in colorectal carcinomas. *In Vivo* 2000;14:656-666
- 22 Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:101-117
- 23 Parsons SL, Watson SA, Collins HM, Griffin NR, Clarke PA, Steele RJ. Gelatinase (MMP-2 and MMP-9) expression in gastrointestinal malignancy. *Br J Cancer* 1998;78:1495-1502
- 24 Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1999;20:749-755
- 25 Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, Abulafi AM. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003;107:541-550
- 26 Michael M, Babic B, Khokha R, Tsao M, Ho J, Pintilie M, Leco K, Chamberlain D, Shepherd FA. Expression and prognostic significance of metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1802-1808

大蒜素抗肿瘤的作用机制

柳 星, 袁 媛

柳星, 袁媛, 中国医科大学肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001
项目负责人: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学肿瘤研究所第三研究室.
收稿日期: 2004-07-26 接受日期: 2004-09-04

摘要

大蒜素(diallyl trisulfide, allicin)又名大蒜新素, 化学名二烯丙基三硫化物, 是从大蒜球茎中分离出的一种化合物, 有多种生物活性, 有抗真菌、抗细菌、降血脂、降血压、防治动脉粥样硬化等心血管疾病的作用, 并具有良好的抗癌、防癌的作用. 大蒜素的抗肿瘤机制为: (1)阻断致癌物的合成、抗突变、抗畸变; (2)对肿瘤细胞的影响: 直接杀伤; 抑制肿瘤细胞增生, 诱导细胞周期特异性阻滞, 诱导凋亡、诱导肿瘤细胞分化及对细胞通讯的影响; (3)调节机体免疫功能: 包括对红细胞、巨噬细胞, T淋巴细胞、NK细胞及IL-2的调节; (4)其他: 对肿瘤药物的增敏作用和抗耐药. 研究结果显示, 大蒜素确实有很好的抗肿瘤作用. 对大蒜素抗肿瘤作用机制的研究很多, 提示了大蒜素抗肿瘤作用是通过多个途径完成的.

柳星, 袁媛. 大蒜素抗肿瘤的作用机制. 世界华人消化杂志 2004;12(11): 2679-2682

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2679.asp>

0 引言

大蒜素(diallyl trisulfide, allicin)又名大蒜新素, 化学名二烯丙基三硫化物, 是从大蒜球茎中分离出的一种化合物, 有多种生物活性, 不仅有抗真菌、抗细菌、降血脂、降血压、防治动脉粥样硬化等心血管疾病的作用^[1], 而且具有良好的抗癌、防癌的作用^[1]. 现就大蒜素的抗肿瘤机制方面的研究作一综述.

1 阻断致癌物的合成、抗突变、抗畸变

大蒜预防多环芳烃和亚硝胺类化学因素致癌^[2]阻断理化因素的致突变性已有报道^[1]. 亚硝酸盐是合成强致癌物亚硝胺的前身物, 大蒜可降低胃内亚硝酸盐含量, 从而影响亚硝胺的合成, 进而降低患胃癌的机率. 王美岭 *et al*^[3]通过体内外实验证明, 大蒜具有阻断亚硝胺合成和降低胃内亚硝胺含量的作用. 乙烯雌酚(DES)可以使人或动物致癌, Green *et al*^[4]研究提示大蒜素可以直接抑制DES的代谢, 阻止DNA加和物的形成, 从而预防雌激素诱导的肿瘤的发生. 邓大君 *et al*^[5]研究大蒜对MNNG(甲基硝基亚硝基胍)、MNU、ENNG以及亚硝化鱼露的致

突变性有阻断作用, 这可能与大蒜中所含有的有机硫化物能与亚硝基结合, 从而加速N-亚硝基化合物的灭活有关. 此外, 大蒜中含有许多富电子结构(-SO-, -SS-, C=C-)的分子, 能与亲电子的终致癌物结合, 从而发挥抗突变作用.

Arivazhagan *et al*^[6]在研究大蒜素的抗畸变性时, 给小鼠腹腔注射MNNG(40 mg/kg)之前先予水溶性大蒜提取物 250 mg/kg 5 d, 观察到其明显地减低了MNNG诱导的核仁和染色体畸变. 证实了大蒜提取物具有保护MNNG的致畸性. Velmurugan *et al*^[7]研究大蒜素对MNNG和S-NaCl(饱和氯化钠)诱导的Wistar δ 鼠胃肿瘤具有抑制作用, 从而达到化学预防肿瘤的效果. Shukla *et al*^[8]在研究大蒜提取物的抗染色体畸变时, 给瑞士白变种鼠ip Cyclophosphamide(CP, 致畸变物)25 mg/kg 之前口服 25 g/L 和 50 g/L 新鲜大蒜提取物 5 d, 也观察到了其明显降低CP诱导的染色体畸变. 证实了大蒜提取物是有力的化学预防CP诱导的染色体畸变的物质. 微卫星序列不稳定性(MI)是细胞DNA遗传不稳定的重要标志^[9], 某些化学致癌物能诱导肿瘤细胞微卫星序列(MS)的突变^[10], 可发生在肿瘤产生的早期阶段^[11-12]. 最近, 文献报道MS是某些致癌物的直接作用环节, 由杂环胺类诱导的动物肿瘤中出现有MS的改变^[10]. 汪承亚 *et al*^[13]研究观察到以RER表型的结肠癌细胞受大蒜素和亚硒酸钠(Na₂SeO₃)作用 5 d, 能减少(Ca)₁₄重复序列的碱基插入或缺失的突变, 因此, 证明他们对DNA突变和MI有直接的抑制作用. 提示他们对人癌细胞MS遗传不稳定有保护作用.

2 对肿瘤细胞的作用

2.1 直接杀伤 解云涛 *et al*^[14]在大蒜素抑制小鼠S180生长的研究中, 从透射电镜中观察到, 肿瘤细胞膜和核膜皱缩, 断裂, 线粒体出现肿胀和空泡样改变, 表明大蒜素对肿瘤细胞有直接杀伤作用. 王海燕 *et al*^[15]在观察大蒜素对胃癌细胞株及移植瘤的作用中, 发现不同质量浓度的大蒜素对SGC-7901和MGC-803胃癌细胞均有一定的杀伤作用, 瘤体组织切片中可见大片肿瘤组织坏死, 得出大蒜素可以直接杀伤胃癌细胞的结论. 俞超芹 *et al*^[16]研究高浓度大蒜素(50-100 mg/L)对HO8910(卵巢癌细胞株)细胞呈直接杀伤作用, 从透射电镜中观察: HO8910细胞肿胀、细胞膜碎裂、胞质脱落、细胞核裸露. 哈敏文 *et al*^[17]研究大蒜素对MGC-803和SGC-

7901 两种胃癌细胞生长均有明显的抑制作用,且呈浓度依赖性.大蒜素抑制 MGC-803 细胞增生 50% 的药物浓度(IC₅₀)24 h 为 6.4 mg/L,大蒜素抑制 SGC-7901 细胞增生 50% 的药物浓度(IC₅₀)24 h 为 7.3 mg/L.

2.2 抑制肿瘤细胞增生

2.2.1 对细胞周期的影响 Sieger *et al*^[18]观察到 1 000 g/L 浓度的大蒜粉能抑制人肝癌细胞 Hep G₂ 和人结直肠癌 Caco2 细胞的生长.大蒜提取物却不能抑制这些细胞的生长,但是当大蒜提取物加上 10% 浓度的大蒜粉时却表现出浓度依赖性的抑制肿瘤细胞生长的作用. Frantz *et al*^[19] 把 HT-29 人腺癌细胞培养在水溶性大蒜提取物中,发现一部分细胞离开培养瓶壁,大蒜能阻滞 HT-29 细胞的细胞周期.离开培养瓶的大蒜治疗组有 89% 的细胞在 G₂/M 期,贴在培养瓶的大蒜治疗组有 27% 的细胞在 G₂/M 期,而正常对照组只有 12% 停滞于 G₂/M 期.说明大蒜能使 HT-29 肿瘤细胞停滞于 G₂/M 期. Filomeni *et al*^[20] 研究大蒜素使神经母细胞 SH-SY5Y 停滞于 G₂/M 期. Knowles *et al*^[21] 应用 25, 50 和 100 mmol/L 的大蒜素作用于人结肠癌细胞(HCT-15)4 h,使 G₂/M 期细胞明显增加. Wu *et al*^[22] 亦研究大蒜素能使人肝癌细胞(J5)阻滞于 G₂/M 期,并呈明显的时间,剂量依赖性.哈敏文 *et al*^[17] 研究 MGC-803 细胞和 SGC-7901 细胞在不同浓度大蒜素诱导 24 h 后收集,流式细胞仪检测结果显示两种细胞的细胞周期均发生了明显变化,主要表现为 G₀/G₁ 期细胞逐渐减少,同时 G₂/M 期细胞逐渐增加,而 S 期细胞无明显变化.同时进行细胞形态学实验,瑞士-姬姆萨染色在光学镜下观察其形态,提示两种细胞系经大蒜素处理后细胞周期阻滞于 M 期.

2.2.2 对细胞信号传导系统的影响 环核苷酸(cAMP、cGMP)是体内重要的生物活性物质,也是体内重要的第二信使,肿瘤组织内 cAMP 含量低于正常组织,提高细胞内 cAMP 水平可抑制肿瘤组织的生长.王美岭 *et al*^[23] 用苍山鲜大蒜滤液、大蒜油和大蒜素给 S₁₈₀ 小鼠腹腔注射,证实其可提高瘤组织内的 cAMP 水平.这一结果表明大蒜可能通过提高作为信号传导系统中第二信使的 cAMP 水平,使一些与细胞生长、分裂和增生有关的信号传递通路处于正常状态,也可能是由于调动了机体的内在抗癌因素 cAMP 的代谢,而抑制肿瘤细胞的过度生长繁殖而起抗癌作用. Sakamoto *et al*^[24] 在研究大蒜中的含硫化合物抑制人类 A549 肺肿瘤细胞体外增生中发现: 10 mmol/L 的 DATS 在治疗的前 4 h 内,引起了 A549 细胞中的细胞内 Ca²⁺ 增加,这可能是在细胞信号传导系统中,作为第二信使的 Ca²⁺ 与钙调蛋白结合形成活性复合物,能够激活一系列酶,包括蛋白激酶、腺苷酸环化酶、磷酸酯酶等而影响细胞增生与分化. NFκB 是一种调控多种细胞基因的转录因子,是许多信号传导通路的共同环节,应激因子、细胞黏附分子、免疫因子、生长因子、凋亡相关因子及活性氧自由基等均是 NFκB 的激活因子. NFκB 的靶基因有多种,主要是与免疫反

应、应激反应、细胞增生及凋亡相关的基因^[25]. 扈启宽 *et al*^[26] 初步证实了大蒜素可能通过降低活性氧类自由基水平,影响培养的胃癌细胞的 NFκB 活性,使 NFκB 结合 DNA 的活性降低, NFκB 通路受到抑制,导致某些基因表达水平改变,从而达到抑制胃癌细胞增生的作用.

2.3 诱导凋亡 Wong *et al*^[27] 从大蒜等植物中提取有机硫化物(OSCs),研究 OSCs 与生长抑制活性的关系时发现: OSCs 能阻滞人类白血病细胞于 G₂/M 期,并于此期发生凋亡. Sigounas *et al*^[28] 研究成熟大蒜提取物中的有机硫化物对红白血病细胞系 HEL 和 OCIM-1 的抗增生作用中,得出结论: 其能有效地抑制 HEL 和 OCIM-1 细胞增生,并诱导凋亡. Sengupta *et al*^[29] 研究了大蒜素能抑制鼠结肠肿瘤增生并诱导凋亡. Filomeni *et al*^[20] 研究大蒜素使诱导神经母细胞 SH-SY5Y 细胞凋亡. 孙丽 *et al*^[30] 研究结果显示,大蒜素能诱导细胞凋亡,其原因可能和端粒酶活性下降有关.端粒酶活性下降后,端粒缩短,细胞有丝分裂受阻,导致细胞凋亡.

2.4 诱导肿瘤细胞分化 李晓光 *et al*^[31] 用激光扫描共聚焦显微镜、Northern 印迹杂交等技术,研究了大蒜油对人胃癌 BGC-823 细胞的作用.结果表明,大蒜油对癌细胞形态结构有明显的影响,使癌细胞的裸鼠致瘤性得到明显抑制,可上调抑癌基因 P53, P21 的表达水平,并使人胃癌细胞中抑癌基因 P53 和 P21 mRNA 表达水平较对照组明显增高,提示大蒜油有诱导肿瘤细胞向正常分化的作用. P53 被认为与细胞分化有密切的关系^[32].

2.5 对细胞间通讯的影响 李晓光 *et al*^[31] 借助于激光扫描共聚焦显微镜等技术观察到细胞在大蒜素无明显杀伤作用的情况下,细胞的增生和形态有明显改变,从形态和核质比例分析,细胞有明显的分化表现,特别是细胞间形成的突起相互连接在一起,从而考虑到多细胞生物体内有严密的细胞间通讯联络,传递基因信号,调控细胞的增生、分化和代谢功能,维持体内平衡.其中细胞间通讯是接触的细胞之间,细胞膜形成通道结构-间隙连接,能通透小分子的信号到另一个细胞的胞质,是组织或细胞群体内信号传递的主要通道.在成体组织和体外培养的细胞,他们与细胞增生调控密切相关.许多肿瘤细胞缺少或无间隙连接通讯.间隙连接通讯与细胞调控及癌变的关系已成为重要的研究领域.实验证明大蒜油有明显的恢复肿瘤细胞间通讯的作用.

3 对机体免疫功能的影响

3.1 对红细胞免疫功能的影响 红细胞除有运输氧及二氧化碳等功能外,还可以通过免疫黏附作用实现免疫功能^[33]. 红细胞表面具有 C₃ b 受体,通过他可以黏附循环中的免疫复合物,将其带到吞噬系统清除,从而达到清除免疫复合物的作用^[33]. 恶性肿瘤患者红细胞免疫功能降低,主要因为血循环中的免疫复合物(有可能是

肿瘤抗原-抗体复合物)含量较高,黏附到红细胞膜C₃b受体增多,C₃b受体空位减少,影响红细胞免疫黏附功能,被称做继发性红细胞免疫功能低下^[34]。应用大蒜素3 mo后恶性肿瘤患者的红细胞免疫功能较用药前明显改善,RCRR(红细胞膜C₃b受体花环试验)明显增高。Virella *et al*^[34]证实红细胞对机体的体液免疫、细胞免疫都有一定的调节作用,且多与红细胞表面C₃b受体有关。

3.2 对巨噬细胞介导的细胞毒作用的影响 H₂O₂是巨噬细胞产生的重要的细胞毒效应分子^[35]。大蒜素可以促进巨噬细胞产生H₂O₂,从而促进巨噬细胞杀/抑癌活性;大蒜素能够增强肝癌细胞(HC)对巨噬细胞细胞毒作用的敏感性^[36]。NO是巨噬细胞产生的又一重要的细胞毒效应分子^[36],巨噬细胞产生的NO可以抑制T细胞激活^[37]。大蒜素能够抑制巨噬细胞产生的NO,促进T细胞激活^[38]。已知肿瘤细胞在生长过程中能够产生肿瘤免疫抑制因子(TDSF),抑制T细胞激活,从而可以逃避免疫攻击^[39]。大蒜素对S₁₈₀和EAC(艾氏腹水癌)产生的TDSF有拮抗作用,可使T细胞激活恢复至接近正常水平,起到了消除TDSF抑制作用的效果^[40]。

3.3 对T淋巴细胞免疫功能的影响 淋巴细胞在机体抗肿瘤免疫应答中通过细胞免疫和体液免疫的直接或间接作用杀伤肿瘤细胞。张志勉 *et al*^[41]研究大蒜素对恶性肿瘤患者淋巴细胞免疫功能的影响中得出:恶性肿瘤患者T淋巴细胞免疫功能显著低于对照组,服用3 mo大蒜素后,T淋巴细胞免疫指标(CD₃, CD₄, CD₈, CD₄/CD₈, CD₂₀, CD₂₅, CD₅₇)接近或高于对照组,即大蒜素能提高恶性肿瘤患者T淋巴细胞免疫功能。

3.4 对NK细胞活性和IL-2的影响 活化的自然杀伤细胞(NK细胞)能迅速分泌大量的细胞因子,如IFN- γ , IFN- α , IL-2, GM-CSF等,通过这些细胞因子发挥抗肿瘤作用,同时调节吞噬细胞的功能。而IL-2是由活化的T细胞合成和分泌的,只有被激活的T细胞才表达高亲和力的IL-2受体,故IL-2与其受体结合后能引起激活的T细胞克隆性增生。有研究表明^[42],大蒜素作为一种免疫激发剂,能有效地提高NK细胞活性和白介素-2(IL-2)水平,增强T淋巴细胞分裂增生及活性。Kasuga *et al*^[43]研究4种大蒜剂型(生大蒜汁、热大蒜汁、脱水大蒜粉、成熟大蒜提取物)均有显著提高患肿瘤鼠脾细胞NK细胞活性。

此外,陆婉芹 *et al*^[44]采用S180和人红白血病K₅₆₂,观察了大蒜对顺铂(PDD)、环磷酰胺(CYT)、5-氟尿嘧啶(5-Fu)、米托蒽醌等抗癌药物的增敏作用。体内实验表明,一次腹腔给予大蒜素(50-200 mg/L),除对CYT有增敏作用外,对上述其他抗癌药并不起增敏作用,而连续给予大蒜素d₁₋₉,对抗癌药才起增敏作用。提示适当调整抗癌药物和大蒜素的剂量,同时增加大蒜素给药次数,可能使大蒜素发挥很好的增敏作用。胎盘型谷胱甘肽转移酶(GST- π),其水平与肿瘤耐药密切相关^[45]。

GST- π 水平升高,标志肿瘤细胞易产生耐药性,反之,不易产生耐药性^[46]。李勇 *et al*^[47]人的研究表明,大蒜素可使人胃腺癌BGC-823细胞的GST- π 水平显著降低,说明大蒜素可以抑制胃癌细胞GST- π 的产生,是一种GST- π 活性抑制剂。据此推断,若大蒜素与其他化疗药联合应用,可增加疗效,降低耐药性。

4 参考文献

- 1 Sengupta A, Ghosh S, Bhattacharjee S. Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004; 5:237-245
- 2 Chen J. The antimutagenic and anticarcinogenic effects of tea, garlic and other natural foods in china: a review. *Biomed Environ Sci* 1992;5:1
- 3 王美岭. 大蒜在体内外抑制亚硝酸合成的研究. *实用肿瘤学杂志* 1990;4:26
- 4 Green M, Thomas R, Gued L, Sadrud-Din S. Inhibition of DES-induced DNA adducts by diallyl sulfide: implications in liver cancer prevention. *Oncol Rep* 2003;10:767-771
- 5 邓大君, 张利, 管政平, 周静, 张汝徽. 大蒜对N-亚硝酰胺致突变作用的影响. *癌变·畸变·突变* 1993;5:18-21
- 6 Arivazhagan S, Nagini S, Santhiya ST, Ramesh A. Protection of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced in vivo clastogenicity by aqueous garlic extract. *Asia Pac J Clin Nutr* 2001;10:238-241
- 7 Velmurugan B, Bhuvaneswari V, Nagini S. Effect of S-allylcysteine on oxidant-antioxidant status during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and saturated sodium chloride-induced gastric carcinogenesis in Wistar rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 2003;12:488-494
- 8 Shukla Y, Taneja P. Antimutagenic effects of garlic extract on chromosomal aberrations. *Cancer Lett* 2002;176:31-36
- 9 Eshelman JR, Markowitz SD. Mismatch repair defects in human carcinogenesis [J]. *Human Molecular Genetics* 1996;5: 1489-1494
- 10 Canzian F, Ushijima T, Serikawa T, Wakabayashi K, Sugimura T, Nagao M. Instability of microsatellite in rat colon tumors induced by heterocyclic amines. *Cancer Res* 1994;54:6315-6317
- 11 Loeb LA. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994;54:5059-5063
- 12 Eshleman JR, Markowitz SD. Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. *Curr Opin Oncol* 1995;7: 83-89
- 13 汪承亚, 周建伟, 倪黎, 丁小健, 赵红, 唐玲芳. 大蒜素和亚硝酸钠对结肠癌细胞微卫星序列不稳定的抑制作用. *癌症* 2000;19:300-303
- 14 解云海, 杨国梁, 杨庆忆, 刘诗权, 侯汉英. 大蒜素对小鼠S₁₈₀的抑制作用及NK细胞活性的影响. *癌症* 1995;14:179-180
- 15 王海燕, 许才斌, 王庆莉. 大蒜素对胃癌细胞株及裸鼠移植瘤的抑制作用. *肿瘤防治研究* 2001;28:94-97
- 16 俞超芹, 蔡在龙, 颜永碧, 张亚妮, 潘瑞萍, 凌昌全. 大蒜素对卵巢癌细胞株HO8910生长的抑制作用. *安徽中医学院学报* 2001;20: 34-36
- 17 哈敏文, 董明, 王兰, 袁媛. 大蒜素协同抗癌药对肿瘤细胞杀伤作用的研究. *中国肿瘤临床* 2004;31:193-196
- 18 Siegers CP, Steffen B, Robke A, Pentz R. The effects of garlic preparations against human tumor cell proliferation. *Phytomedicine* 1999;6:7-11
- 19 Frantz DJ, Hughes BG, Nelson DR, Murray BK, Christensen MJ. Cell cycle arrest and differential gene expression in HT-29 cells exposed to an aqueous garlic extract. *Nutr Cancer* 2000; 38:255-264
- 20 Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res* 2003;63:5940-5949
- 21 Knowles LM, Milner JA. Diallyl disulfide induces ERK phosphorylation and alters gene expression profiles in human colon tumor cells. *J Nutr* 2003;133:2901-2906

- 22 Wu CC, Chung JG, Tsai SJ, Yang JH, Sheen LY. Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. *Food Chem Toxicol* 2004; 42:1937-1947
- 23 王美岭, 韩金祥. 大蒜与肿瘤. *中国肿瘤* 1994;3:6-8
- 24 Sakamoto K, Lawson LD, Milner JA. Allyl sulfides from garlic suppress the in vitro proliferation of human A549 lung tumor cells. *Nutr Cancer* 1997;29:152-156
- 25 Bours V, Bentires-Alj M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, Benoit V, Merville MP. Nuclear factor-KappaB, cancer, and apoptosis[J]. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1085-1089
- 26 扈启宽, 李文梅, 赵喜荣, 吕有勇. 大蒜素对胃癌细胞 NF κ B 活性的影响. *解放军药学报* 2002;18:7-10
- 27 Wong WW, Macdonald S, Langer RF, Penn LZ. Novel synthetic organosulfur compounds induce apoptosis of human leukemic cells. *Anticancer Res* 2000;20:1367-1374
- 28 Sigounas G, Hooker JL, Li W, Anagnostou A, Steiner M. S-allylmercaptocysteine, a stable thioallyl compound, induces apoptosis in erythroleukemia cell lines. *Nutr Cancer* 1997;28: 153-159
- 29 Sengupta A, Ghosh S, Bhattacharjee S, Das S. Indian food ingredients and cancer prevention -an experimental evaluation of anticarcinogenic effects of garlic in rat colon. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004;5:126-132
- 30 孙丽, 王绪, 潘友金. 大蒜素对人胃腺癌 SGC-7901 细胞株端粒酶活性和细胞凋亡的影响. *解放军医学杂志* 2003;28:445-446
- 31 李晓光, 谢锦玉, 李文梅, 季加孚, 赵敏, 崔建涛, 孙梅, 吕有勇. 大蒜油对人胃癌细胞恶性增生能力和细胞间通讯的影响. *中国科学 (C 辑)* 1998;28:366
- 32 Lee JM, Bernstein A. P53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5742-5746
- 33 陈泉宁, 沈炎明, 郭峰. 胃癌患者红细胞免疫功能变化规律的研究. *实用医学杂志* 2004;20:243-245
- 34 Virella G, Rugeles MT, Hyman B. The interaction of CD₂ with its SLFA-3 ligand expressed by autologous erythrocytes results in enhancement of B cell responses. *Cell Immune* 1988; 116:308
- 35 Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141:2407-2412
- 36 张桂梅, 冯作化, 郝天玲, 张慧, 姜志尧. 大蒜素对巨噬细胞介导的细胞毒作用的影响. *中国中药杂志* 1996;21:45-47
- 37 Oh SK, Moolten FL. Nonspecific immunosuppressive factor in malignant ascites: further characterization and possible relationship to erythrocyte receptors of human peripheral T cells. *J Immunol* 1981;127:2300-2307
- 38 Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate nitrite and nitrate in response to escherichia colilipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7738-7742
- 39 张桂梅, 冯作化, 郝天玲, 张慧, 姜志尧. 大蒜素对 T 细胞激活的影响. *中药药理与临床* 1995;1:26-28
- 40 郝天玲, 张桂梅, 冯作化, 张慧, 姜志尧. 几种肿瘤免疫抑制因子作用的研究. *同济医科大学学报* 1995;24:105-108
- 41 张志勉, 高海青, 王德斌, 时庆. 大蒜素对恶性肿瘤患者淋巴细胞免疫功能的影响. *山东大学学报(医学版)* 2002;40:245-246
- 42 唐瞻贵, 沈子华, 刘蜀凡, 翦新春, 孙科柱, 燕美玉, 何堂良. 大蒜对口腔癌前病变的预防作用及其对 NK、T 淋巴细胞功能和 IL-2 影响的实验研究. *湖南医科大学学报* 1997;22:246
- 43 Kasuga S, Uda N, Kyo E, Ushijima M, Morihara N, Itakura Y. Pharmacologic activities of aged garlic extract in comparison with other garlic preparations. *J Nutr* 2001;131:1080s-1084s
- 44 陆婉琴, 金杏泉, 徐静芳. 大蒜素对抗癌药物作用的初步研究. *肿瘤* 1992;12:113-115
- 45 李继梅, 姜平, 唐睿珠, 王秦秦, 孙丽亚, 张立新, 李春海, 王红丽. 乳腺癌窝淋巴结 GST- π mRNA 的表达及其临床意义. *云南医药* 2000;21:1-2
- 46 张学庸. 胃癌的基础研究与临床. 北京: 科技出版社, 1996:70-71
- 47 李勇, 刘冀红, 赵群, 范立侨, 于跃明, 王力利, 赵雪峰, 张志栋, 焦志凯, 马志学, 刘品一. 大蒜素对人胃癌 BGC-823 细胞影响的研究. *中国中西医结合外科杂志* 2001;7:307-310

功能性消化不良的中西医结合诊治方案

张万岱, 危北海, 陈治水

中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会

张万岱, 危北海, 陈治水. 功能性消化不良的中西医结合诊治方案. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2683-2686

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2683.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)系指不能以器质性疾病解释而见有持续性或反复发作性上腹部疼痛和餐后饱胀、腹部胀气、嗝气、早饱、恶心等上腹部不适症状的一组临床症候群。

1 临床表现

症状: 上腹痛: 指上腹正中部位疼痛, 可为隐痛、胀痛、空腹痛或餐后痛等; 上腹不适: 指上腹胀、早饱、胀气、恶心等。

体征: 多不明显。

2 类型

2.1 西医分型

2.1.1 溃疡型 以上腹痛、饥饿痛、或伴反酸水为主要症状, 进食及制酸剂可缓解。

2.1.2 动力障碍型 以上腹胀、嗝气、早饱及恶心为主要症状。

2.1.3 非特异型 症状难以归属上述任何一型, 或两型症状混杂者。

2.2 中医证型

2.2.1 肝气郁结证

2.2.1.1 主要症候 (1)脘胁胀痛, 痛无定处。(2)脘闷嗝气。(3)急躁易怒。(4)脉弦。

2.2.1.2 次要症候 (1)口苦。(2)失眠或多梦。(3)精神抑郁, 喜长叹息。(4)咽部异物感。(5)烧心或泛酸。(6)腹胀纳呆或呕吐。(7)舌淡红或尖边红, 苔薄黄。

2.2.1.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 1 项, 或主证第 1 项加次证 3 项。

2.2.2 脾胃气虚证

2.2.2.1 主要症候 (1)脘腹痞满隐痛, 劳累后加重或饥饿时疼痛。(2)纳差而饱。(3)大便溏软。(4)舌质淡, 体胖有齿痕, 苔薄白或白腻。

2.2.2.2 次要症候 (1)泛吐清水。(2)嗝气不爽。(3)口淡不渴。(4)头晕乏力。(5)脉细弱。

2.2.2.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 1 项, 或主证

第 1 项加次证 2 项。

2.2.3 肝气犯胃证

2.2.3.1 主要症候 (1)胃脘痞满, 闷胀不舒, 胀及两胁, 情志不遂易诱发或加重。(2)嗝气反胃。(3)烧心泛酸。(4)心烦急躁。(5)脉弦或弦细。

2.2.3.2 次要症候 (1)两胁气窜走痛。(2)口干口苦。(3)小便淡黄。(4)舌质黯红, 苔薄白或白厚。

2.2.3.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 1 项, 或主证第 1 项加次证 2 项。

2.2.4 湿热滞胃证

2.2.4.1 主要症候 (1)胃脘痞满, 闷胀不舒。(2)恶心欲吐或呕吐。(3)纳呆食少。(4)嗝气不爽。(5)舌质红, 苔黄腻。

2.2.4.2 次要症候 (1)头身困重, 肢软乏力。(2)口苦吐酸。(3)大便不爽而滞。(4)小便黄赤。(5)脉濡数或细数。

2.2.4.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 2 项, 或主证第 1 项加次证 2 项。

合并慢性胃炎者按其分型处理。

3 诊断和鉴别诊断

3.1 诊断标准

3.1.1 过去 1 a 内至少 4 wk、科研至少 12 wk(不需连续)具有上腹痛或不适(上腹胀、早饱、胀气、恶心、嗝气)等症。

3.1.2 排除消化性溃疡、胃肿瘤和肝胆胰疾病、全身性疾病等可解释上述症状的器质性疾病者。

3.1.3 排除以腹痛、大便次数和性状异常为主症的肠易激综合征者。

3.2 鉴别诊断 为达到上述两个“排除”, 必须进行以下各项检查:

3.2.1 详细问病、系统查体 详细询问病史以了解患者的症状类型, 判断症状的来源和性质。同时要特别注意了解对药物的治疗反应, 有无精神刺激、抑郁、焦虑, 是否服用非甾体抗炎药等。体格检查要系统全面, 功能性消化不良患者体检常无阳性发现, 但要特别注意营养状态, 腹部压痛的部位和范围, 肝脾有无肿大。

3.2.2 实验室检查 为排除器质性疾病, 下列项目应作为常规检查: 血、尿、便常规, 粪隐血试验, 肝、肾功能, 血糖, 病毒性肝炎血清标志物, 必要时测定相应的肿瘤标志物。

3.2.3 器械检查

3.2.3.1 胸部 X 线摄片、心电图、肝胆胰 B 型超声、

胃镜应作为常规检查,不愿或不适应胃镜检查者可可行气钡双重造影。

3.2.3.2 CT或ERCP 个别患者B型超声不能明确者,必要时尚需做CT或ERCP。

3.2.3.3 体表胃电图 功能性消化不良患者胃动过缓比较多见,也可有胃动过速或节律失常。

3.2.3.4 胃排空功能测定 常用放射性核素闪烁扫描技术测定液体或固体食物的排空时间,钡条内服法及实时超声测定胃排空的方法,大约有50%的功能性消化不良患者存在固体排空延迟。

3.2.3.5 胃腔内压力测定 多用气囊测压法和末端开放灌注导管测压法,功能性消化不良常有近端胃容受性舒张障碍和餐后胃窦运动减弱。

CT或ERCP及体表胃电图、胃排空功能测定、胃腔内压力测定等不是诊断功能性消化不良所必须的,尤其后三者,只是了解功能性消化不良患者有无运动功能障碍的方法手段(图1)。

4 疗效判断标准

4.1 总疗效

4.1.1 临床治愈 症状、体征消失或改善在3级以上,异常指标基本恢复正常、保持2 mo以上不再复发;

4.1.2 显效 症状、体征减少或改善在2级以上,异

常指标明显改善;

4.1.3 好转 症状、体征减轻或改善在1级以上,异常指标好转。

4.1.4 无效 症状、体征及异常指标均无好转。

4.2 症状疗效 按临床治愈、显效、好转、无效4个层次来表达,按计分法算出相应的率和总有效率。

4.2.1 症状分级 (表1)。

4.2.2 疗效指数 按每级3分计,即I级3分、II级6分、III级9分、IV12级分,

计算疗效指数:疗效指数=(疗前证候总分-疗后剩分数)/疗前证候总分 \times 100%

疗效指数<25%为无效;26%~50%为好转;51~85%为显效;>86%为临床治愈。

5 治疗

5.1 一般治疗

5.1.1 耐心解释,增强信心 说明本病不是器质性病变,仅属功能失调所致,经调理和治疗是可以治愈的。要保持心情舒畅,增强胜病信心。必要时给予镇静和抗焦虑治疗。

5.1.2 避免刺激性食物和药物 不吃辛辣、肥腻冷硬食物,避免浓茶、咖啡、烟、酒和非甾体抗炎药(NSAIDs)。对早饱、餐后腹胀明显者,建议低脂肪及

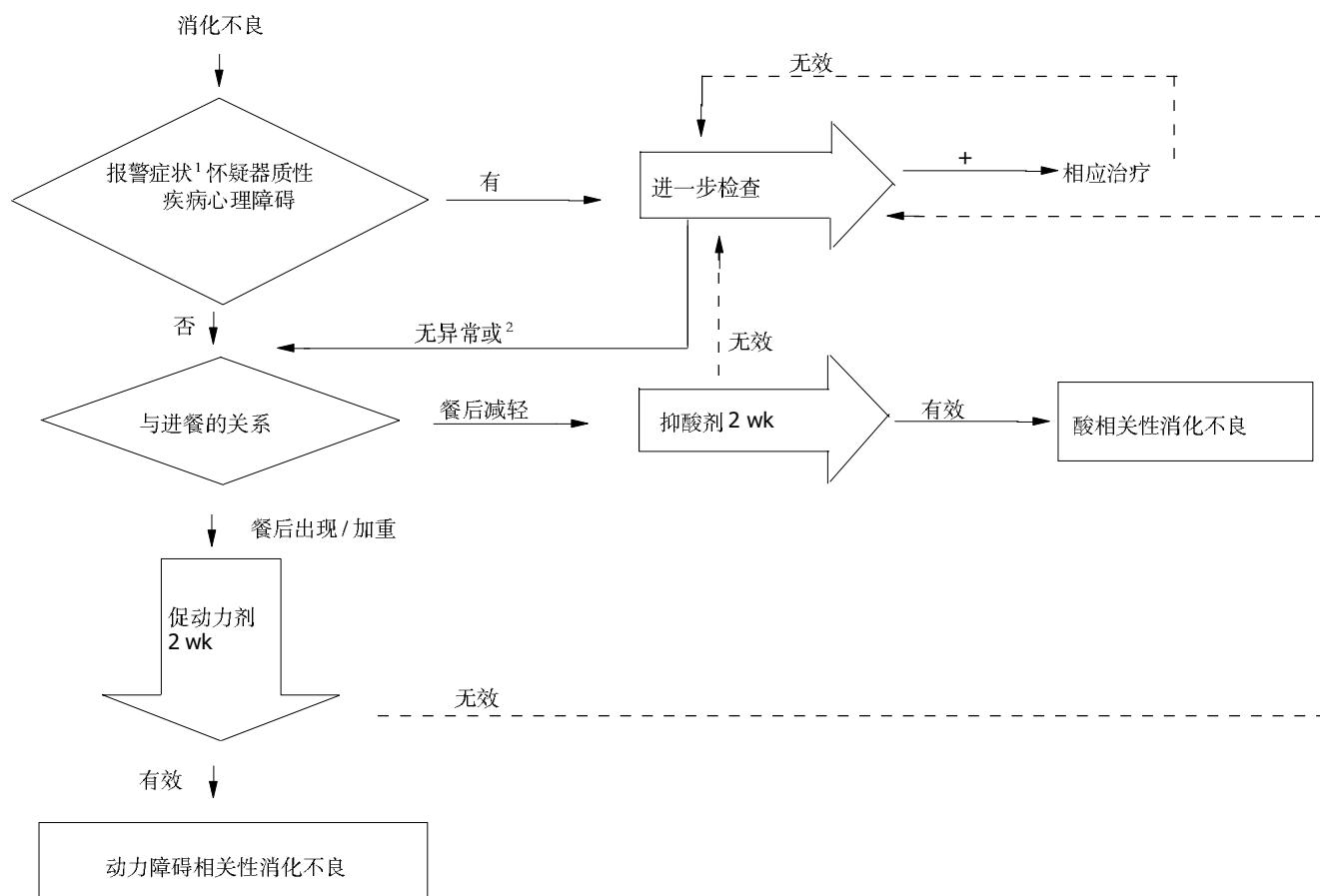


图1 我国消化不良的诊断流程。¹报警症状是指 年龄>45岁、体质量下降(>3 kg)、呕吐、吞咽困难、贫血、黄疸、发热、便血等;²胃镜病理活检为非活动性慢性胃炎。

表1 症状分级

症状	无(0分)	轻(3分)	中(5分)	重(7)
精神疲乏	无	每天精神不振,不喜多言,但能坚持工作	精神疲惫,困倦少言,工作能力下降	精神极度疲乏,欲倦卧不言,工作能力明显下降,几不能工作
四肢无力	无	偶有四肢倦怠,可坚持一般体力劳动	四肢疲软,不思体力活动,勉强维持一般活动	四肢极无力,不耐日常一般活动
胃纳减少	无	每天进食乏味,但基本保持原食量	无食欲,食量较以前减少 1/3 食量	厌恶进食,较以前减少 1/2 以上
腕肋疼痛(或为隐痛、胀痛)	无	每天偶有腕肋疼痛,1 h 内可自行缓解	每天经常腕肋疼痛,程度可忍受持续 1-3 h 才能缓解	每天明显腕肋疼痛,每天持续 >3 h, 程度多不能耐受,需服药后才能缓解
餐后腹胀	无	每天餐后腹胀,轻微,1 h 内可缓解,不影响工作生活	经常餐后腹胀,持续 1-3 h, 部分影响工作生活	明显餐后腹胀,持续>3 h, 不缓解,明显影响工作和生活
暖气	无	偶有暖气,每天≤4 次	经常暖气,每天 4-10 次	频繁暖气,每日>10 次
泛酸	无	偶有泛酸,每天≤4 次	经常泛酸,每天 4-10 次	频繁泛酸,每天>10 次
早饱	无	偶有早饱,不影响食欲和食量	经常早饱,稍影响食欲和食量	持续早饱,明显影响食量
恶心呕吐	无	偶有恶心,无物吐出,每天≥2 次	经常恶心,每天 3-4 次,时出涎沫或食物残渣	明显恶心,每次多伴有呕吐,吐出食物残渣,每天>4 次
咽部梗阻感	无	偶有咽部梗阻感,不影响进食,症状可自行缓解	经常有咽部梗阻感,轻微影响进食,服药可缓解.	持续咽部梗阻感,明显影响进食,服药难以缓解.
烦躁易急	无	偶有烦躁易急,情绪不宁,可以自控	经常烦躁易急,有时难以自控	持续烦躁易急,难以自控
失眠多梦	无	偶有失眠多梦,有时不易入睡,或易醒,一般睡眠 6-7 h	经常失眠多梦,经常不易入睡,或早醒,或多梦,睡眠 4-6 h	频繁失眠多梦,不易入睡,早醒或多梦,睡眠 4 h 左右

少食多餐.

5.2 药物治疗

5.2.1 促胃肠动力剂 对各型,特别是动力障碍型消化不良疗效显著.可用吗丁啉 10-20 mg, 3-4 次/d; 西沙比利或莫沙比利 5-10 mg, 3 次/d.

5.2.2 胃肠动力调节剂 马来酸曲美布汀(商品名援生力维 100 mg, 3 次/d, 口服), 马来酸三甲氧苯丁氨酯(商品名舒丽启能 20 mg, 3 次/d, 口服)均对胃肠动力有双向调节作用,特别适用于胃肠动力紊乱、肠易激综合征大便秘泻交替出现者.

5.2.3 抑酸剂 适用于溃疡型消化不良患者.可用H₂受体阻断剂,如泰胃美 800 mg, 1 次/d, 睡前服; 雷尼替丁 150 mg, 2 次/d; 法莫替丁 20 mg, 2 次/d. 也可用质子泵抑制剂,如奥美拉唑 20 mg, 1 次/d; 兰索拉唑 30 mg, 1 次/d; 泮托拉唑 30 mg, 1 次/d; 雷贝拉唑 10 mg, 1 次/d; 埃索美拉唑 20 mg, 1 次/d.

5.2.4 胃黏膜保护剂 对合并慢性胃炎者尤为适用.如铋剂(德诺、丽珠得乐、果胶铋、迪乐等), 硫糖铝, 麦滋林, 施维舒, 喜克溃等任选一种.

5.2.5 其他药物

5.2.5.1 内脏止痛剂非多托素(Fedotozine, 为 Kappa 激动剂)能降低胃的高敏性, 有止痛作用.

5.2.5.2 5-HT₁ 激动剂如舒马普坦(Sumatriptan)、丁螺环酮(Buspirone)能改善胃的容受性、改善与进食有关的症状.

5.2.5.3 止呕剂恩丹司琼(Ondansetron)或格拉司琼为 5-HT₄ 受体拮抗剂, 对恶心呕吐症状有效.

5.2.5.4 抗焦虑抑郁药阿普唑仑(佳乐定)2 mg, 1 次/晚或 3 次/d; 帕罗西汀 20 mg, 1 次/d, 对症状顽固及精神症状者有效.

5.3 中医中药治疗

5.3.1 辨证论治

5.3.1.1 肝气郁结证 治则: 疏肝解郁、理气消滞. 方药: 柴胡疏肝散合越鞠丸加减(柴胡、白芍、枳壳、陈皮、川芎、香附、神曲、苍术、栀子、甘草). 加减: 胁痛明显者加延胡索、川楝子; 腹胀明显者加川朴、大腹皮、广木香; 咽部有异物感者加炙半夏、厚朴、桔梗; 烧心泛酸者加乌贼骨, 煅瓦楞子.

5.3.1.2 脾胃气虚证 治则: 健脾益气, 和胃降逆. 方药: 香砂六君子汤加减(木香、砂仁、半夏、陈皮、人参、茯苓、白术、甘草、生姜、大枣). 加减: 纳差食少者加炒三仙; 泛吐清水者加吴茱萸, 高良姜; 腹泻者加炒扁豆、淮山药、炒薏苡仁; 腹胀明显者加大腹皮、沉香.

5.3.1.3 肝气犯胃证 治则: 疏肝解郁, 和胃降逆. 方药: 四逆散合沉香降气散加减(柴胡、白芍、枳实、沉

香、香附、砂仁、延胡索、川楝子、甘草)。加减: 噎气、呃逆者加旋复花、代赭石; 烧心泛酸者加浙贝母、煅乌贼骨; 心烦易怒者加炒山栀、合欢花; 泛吐苦水者加炒吴茱萸、酒炒黄连。

5.3.1.4 湿热滞胃证 治法: 清热化湿, 理气和胃。方药: 三仁汤加减(杏仁、白蔻仁、薏苡仁、半夏、厚朴、通草、滑石、淡竹叶)。加减: 恶心呕吐者加竹茹、橘

皮、生姜汁; 痞满明显者加川黄连、全瓜蒌、生姜; 纳差者加炒谷芽、炒神曲; 大便滞下不爽者加枳实、槟榔片。

5.3.2 中成药治疗 如香砂六君子丸、陈香片、六味能消、六味安消、胃力康、气滞胃痛冲剂等。

5.3.3 针灸治疗 如取穴足三里、风市、风池、曲池、胃俞等。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

影响因子记录中国期刊进步足迹

《科学时报》2004-06-24 报道: 美国科学信息研究所的《期刊影响因子 - 网络版》(The Journal Citation Reports on the Web) 6月18日公布了2003年度5907种来源期刊的影响因子。中国期刊影响因子较2002年再创新高。

2003年SCI网络版收录中国学术期刊76种, 2003年JCR网络版公布的是前两年在收的70种中国期刊(含中国机构主办由外国出版商代为出版的期刊)的影响因子。经统计, 70种期刊的影响因子总值为39.718, 平均值为0.567; 若按收录期刊76种计算平均值为0.523。

中国学术期刊年年都有进步。就整体而言, 中国在1999年以前未曾有过影响因子达到1的期刊, 2000年仅有1种期刊影响因子刚好为1, 2001年有2种期刊影响因子超过1, 2002年则有6种期刊影响因子超过1, 而2003年共有11种期刊影响因子超过1。

从收录期刊数和影响因子平均值来看, 1997-2003年收录中国期刊总数分别为36种, 45种, 57种, 63种, 66种, 70种和76种; 有影响因子的期刊分别为21种, 32种, 37种, 48种, 60种, 64种和70种。按收录期刊总数计算影响因子平均值, 7年分别为: 0.125; 0.159; 0.178; 0.240; 0.351; 0.422和0.523, 若仅按有影响因子的期刊数计算平均影响因子, 则这7年分别为: 0.214; 0.224; 0.274; 0.313; 0.386; 0.452和0.567。

从各年度中国期刊影响因子最高值看, 1997-2003年分别是: 0.513(《中国科学: B辑》); 0.818(《高能物理与核物理》); 0.839(《生物医学与环境科学》); 1.000(《地质学报》); 2.102(《细胞研究》); 2.532(《世界胃肠病学杂志》); 3.318(《世界胃肠病学杂志》)。这几串单向变化的数字已清晰记录了中国期刊整体进步的足迹。

近两年连续排在中国期刊影响因子第一位的《世界胃肠病学杂志》(World Journal of Gastroenterology), 自1998年开始被SCI收录。JCR 2000年度报告中, 该刊影响因子为0.993, 2001年为1.445。在这两年也均是中国期刊中影响因子较高者。该刊在SCI中归属“胃肠病学与肝脏病学”(Gastroenterology & Hepatology)类目, 此类目2001年和2003年都是收录47种专业期刊, 该刊影响因子在这两年中分别排在此类目第27位、第11位, 可谓后起之秀。

中国期刊影响因子提高较快有以下原因: 一是国家对科研投入大幅增长, 科研创新条件改善, 使高水平科研成果不断增多, 从而投送到国内期刊上发表的高质量研究成果相应增加, 期刊质量得以提高。二是经过各方面的努力, 我国期刊编辑规范化程度和国际化程度有一定提高。三是SCI近年新增入选中国期刊较多, 中国期刊的增多开始产生了一定的“协同效应”。四是部分期刊实现了印刷版、电子版并存发行的发展态势, 提高了期刊的显示度和可获得性。五是不少期刊出版周期有所缩短, 增强了时效性。六是中国期刊原有指标基数较低, 在低指标基础上提高指标相对容易。

《世界胃肠病学杂志》等刊影响因子快速提升, 除上述原因外, 该刊编辑部的开放意识和网络技术帮了大忙。该刊在中国学术期刊中不仅建设了比较理想的期刊网站, 还率先加入了美国国立医学图书馆(National Library of Medicine, NLM)的PubMed系统, 通过PubMed系统为读者提供1998年以来的全文免费阅读和下载。随后又加入了Free Medical Journals免费阅读网站和Directory of Open Access Journals免费阅读网站, 利用这些重要的期刊免费开放平台, 广泛向全世界开放, 让全世界同行不仅能检索到, 还能免费下载使用其全文。编辑部紧跟时代步伐的开放意识、利用网络技术的能力和服务作者、服务读者的精神, 为作者投稿、读者查阅下载极大地提供了方便, 同时也赢得了期刊声誉、期刊显示度和利用率的明显提高。

中国学术期刊进步很大, 但相比国际名刊还有不小差距。如2003年JCR中影响因子最高值为52.280; 6907种来源期刊的平均影响因子值为1.592。显然中国期刊的发展仍是任重道远。国家科技部、自然科学基金委员会、中国科学院等科技管理部门和学术机构应继续支持中国学术期刊; 各学科院士、学术带头人要积极关心中国学术期刊, 为之献计献策, 将自己高水平科研成果更多地投送到国内期刊上发表, 使中国学术期刊获得进一步发展, 取得更好的成效。

注: 由The Journal Citation Reports on the Web直接从“Peopls R China”检索只有67种期刊。文中70种中国期刊是按我国通常采用的统计方法, 计入了包含了由中国电子学会主办的《电子学报》(Chinese Journal of Electronics)、由中国化学学会主办的《高分子科学》(Chinese Journal of Polymer Science)及《亚洲天然产品研究杂志》(Journal of Asian Natural Products Research)3种在境外或国外出版的期刊。按67种期刊统计, 其影响因子总值为38.022, 平均值也为0.567。(科学时报 2004-06-24 赵基明)

消化性溃疡的中西医结合诊治方案

张万岱, 陈治水, 危北海

中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会

张万岱, 陈治水, 危北海. 消化性溃疡的中西医结合诊治方案. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2687-2689

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2687.asp>

0 引言

胃或十二指肠黏膜的局限性组织缺损, 表浅者为糜烂; 深达肌层者为溃疡. 组织缺损系由胃酸、胃蛋白酶自我消化所致, 故称消化性溃疡. 近年发现其发病与幽门螺杆菌(*H pylori*)感染关系密切, 故对 *H pylori*(+)者又称 *H pylori* 相关性溃疡.

1 临床表现及类型

起病缓慢, 病程迁延, 上腹痛具有周期性、节律性等特点, 伴反酸暖气, 上腹部有局限性压痛, 可有神经功能症候群.

1.1 西医分类 胃溃疡、十二指肠溃疡, 或特殊类型溃疡如: 穿透性溃疡、隐匿型溃疡、幽门管溃疡、多发性溃疡、复合性溃疡、球后溃疡、巨大型溃疡、老年性溃疡、小儿溃疡以及类固醇性溃疡等.

1.2 中医证型

1.2.1 肝胃不和证

1.2.1.1 主要症候 (1)胃脘胀痛, 窜及两胁. (2)善叹息, 遇情志不遂胃痛加重. (3)暖气频繁. (4)嘈杂泛酸. (5)脉弦.

1.2.1.2 次要症候 口苦. (1)胸闷食少. (2)性急易怒. (3)舌质淡红, 苔薄白或薄黄.

1.2.1.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 1 项, 或主证第 1 项加次证 2 项.

1.2.2 脾胃虚寒证

1.2.2.1 主要症候 胃脘隐痛, 喜暖喜按. (1)空腹痛重, 得食痛减. (2)泛吐清水. (3)舌质胖, 边有齿痕, 苔薄白.

1.2.2.2 次要症候 (1)畏寒肢冷. (2)头晕或肢倦. (3)纳呆食少. (4)便溏腹泻. (5)脉沉细或迟.

1.2.2.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 1 项, 或主证第 1 项加次证 2 项.

1.2.3 胃阴不足证

1.2.3.1 主要症候 (1)胃脘隐痛或灼痛. (2)似饥而不欲食, 口干不欲饮. (3)大便干燥. (4)舌红少津裂纹、少苔、无苔或剥苔.

1.2.3.2 次要症候 (1)口干舌燥. (2)纳呆干呕. (3)失眠多梦. (4)手足心热. (5)小便淡黄. (6)脉细数.

1.2.3.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 1 项, 或主证第 1 项加次证 2 项.

1.2.4 寒热夹杂证

1.2.4.1 主要症候 (1)胃脘隐痛或胀痛, 喜温按. (2)口苦而淡. (3)呕吐酸水. (4)舌淡或淡红, 体胖有齿痕, 苔黄白相间或苔黄腻.

1.2.4.2 次要症候 (1)口干失眠. (2)大便时干时稀. (3)小便淡黄. (4)脉细弦.

1.2.4.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 2 项.

1.2.5 瘀血阻络证

1.2.5.1 主要症候 (1)胃脘痛如针刺或如刀割, 痛处不移. (2)胃痛拒按, 食后胃痛加重. (3)舌质紫暗或见瘀斑.

1.2.5.2 次要症候 (1)胃痛剧烈, 可痛彻胸背, 肢冷汗出. (2)呕血或黑便史. (3)脉涩或沉弦.

1.2.5.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 1 项.

2 诊断标准

2.1 慢性、周期性、节律性上腹痛伴反酸者 - 初步诊断

2.2 伴有上消化道出血、穿孔史或现症者 - 基本诊断

2.3 胃镜发现消化性溃疡病灶(兼查 *H pylori*, 方法如尿素酶实验或 C^{14} -UBT), 或上消化道气钡双重造影检查见胃或十二指肠有龛影或球部变形者 - 确定诊断.

良性溃疡内镜下分三期六段: 活动期(A 期, A_1A_2)、愈合期(H 期, H_1H_2)和瘢痕期(S 期, S_1S_2). A_1 期: 溃疡呈圆形或椭圆形, 中心覆盖厚白苔, 可伴有渗血或血痂, 周围潮红, 充血水肿明显; A_2 期: 溃疡覆盖黄色或白色苔, 无出血, 周围充血水肿减轻. 一些十二指肠溃疡表现为多个散在、浅表溃疡, 呈斑点状或小片状, 内镜下酷似白霜覆盖在充血、水肿黏膜上, 称为“霜斑样溃疡”, 可能是溃疡处于 A 期进展过程或愈合中的一种表现. H_1 期: 溃疡处于愈合中, 其周围充血、水肿消失, 溃疡苔变薄、消退, 伴有新生毛细血管; H_2 期: 溃疡继续变浅、变小, 周围黏膜皱襞向溃疡集中. S_1 期: 溃疡白苔消失, 呈现红色新生黏膜, 称红色瘢痕期; S_2 期: 溃疡的新生黏膜由红色转为白色, 有时不易与周围黏膜区别, 称白色瘢痕期.

诊断内容举例: 十二指肠球部溃疡, A_1 期, 寒热夹杂型, *H pylori* (+).

3 疗效判定标准

3.1 临床治愈 症状全部消失, 溃疡疤痕愈合或无痕迹愈合, *H pylori* 根除.

3.2 显效 主要症状消失, 溃疡达愈合过程期(H₂), *H pylori*根除。

3.3 有效 症状有所减轻, 溃疡达愈合过程期(H₁), *H pylori*减少。

3.4 无效 症状、内镜及 *H pylori* 检查均无好转者。

4 治疗

4.1 避免致病外因 避免精神紧张, 保持心情舒畅, 树立胜病信心; 避免刺激性食物、烟、酒、咖啡、浓茶和非甾体抗炎药物。

4.2 改善机体内因 调节神经功能, 进行精神心理治疗, 针对患者实际情况, 给予镇静剂或抗抑郁药; 调节胃肠功能, 酌情分别给予解痉剂(阿托品、普鲁本辛、颠茄片等)、促动力剂(吗丁啉、西沙比利、莫沙比利、曲美布汀等)、抗胆汁反流剂(消胆胺、铝碳酸镁、甘羧铝片等)。

4.3 克服攻击因子

4.3.1 制酸剂 如碳酸氢钠、碳酸钙、氧化镁、氢氧化铝、氢氧化镁等。

4.3.2 抑酸剂 如 H₂ 受体拮抗剂(西米替丁、雷尼替丁、法莫替丁、尼扎替丁等), 质子泵抑制剂(奥美拉唑、兰索拉唑、泮托拉唑、雷贝拉唑、埃索美拉唑等), 胃泌素受体拮抗剂(丙谷胺), 毒蕈碱受体拮抗剂(颠茄、阿托品、山莨菪碱、哌吡氮平等)。

4.4 增强防御因子 应用黏膜保护剂如铋剂(德诺、丽珠得乐、果胶铋等)、硫糖铝、米索前列醇(喜克溃)、麦滋林、施维舒等。

4.5 抗 *H pylori* 治疗

4.5.1 *H pylori* 感染治疗适应证 (表 1)。

表 1

<i>H pylori</i> 阳性的下列疾病	必须	支持	不明确
消化性溃疡 ¹	√		
早期胃癌术后	√		
胃 MALT 淋巴瘤	√		
明显异常的慢性胃炎 ²	√		
计划使用 NSAIDs		√	
部分功能性消化不良(FD) ³		√	
GERD		√	
胃癌家族史		√	
个人强烈要求治疗者			√
胃肠道外疾病			√

¹PU(GU 或 DU): 无论活动或陈旧, 无论有无并发症; ²明显异常: 指合并糜烂, 中-重度萎缩, 中-重度肠化生, 中-重度不典型增生; ³溃疡型 FD 或其他疗法无效者。

4.5.2 *H pylori* 根除推荐的治疗方案 一线方案(按疗效顺序排列)(1)PPI/RBC(标准剂量)+ A(1.0 g)+ C(0.5 g) 2/d×7 d; (2) PPI/RBC(标准剂量)+ M(0.4 g)+ C(0.5 g)2/d×7 d;

(3) PPI/RBC(标准剂量)+ A(1.0 g)+ F(0.1 g)/M(0.4 g) 2/d×7 d; (4)B(标准剂量)+ F(0.1 g)/M(0.4 g)+ C(0.5 g) 2/d×7 d; (5)B(标准剂量)+ M(0.4 g)+ T(0.75-1.0 g)2/d×14 d; (6)B(标准剂量)+ M(0.4 g)+ A(0.5 g) 2/d×14 d。

因病情或经济状况也可以 H₂ 受体阻断剂(H₂RA)替代 PPI(如: 西米替丁 400 mg、雷尼替丁 150 mg、法莫替丁 20 mg)。

二线方案: (1)PPI(标准剂量)+B(标准剂量)+M(0.4 g 3/d)+T(0.75-1.0 g)2/d×7-14 d; (2) PPI(标准剂量)+B(标准剂量)+F(0.1 g)+T(0.75-1.0 g)2/d×7-14 d. 代号说明: (1) PPI(质子泵抑制剂), 目前有埃索美拉唑(E)20 mg、雷贝拉唑(R)10 mg、兰索拉唑(L)30 mg、奥美拉唑(O)20 mg; (2)RBC(枸橼酸铋雷尼替丁)350 mg; (3)A: 阿莫西林; (4) C: 克拉霉素; (5)M: 甲硝唑或替硝唑; (6)T: 四环素; (7)B: 铋剂(枸橼酸铋钾、果胶铋等); (8)F: 呋喃唑酮

4.5.3 如何选择治疗方案 (1)方案因病种稍异: 活动性消化性溃疡疼痛症状明显时, 选用抑酸分泌剂为基础的方案。 (2)以疗效为主: 选择的抗生素中包含克拉霉素, 可使 *H pylori* 的根除率提高 10-20%。 (3)考虑经济问题: H₂RA 或铋剂+2 种抗生素(选价格便宜者, 如甲硝唑、替硝唑、呋喃唑酮、阿莫西林、胃内滞留型庆大霉素缓释片等)。 (4)短疗程: 含克拉霉素的方案疗程为 1 wk。 (5)根除治疗失败者: 可改用二线方案或酌情更换敏感药物或适当增加抗生素(克拉霉素、阿莫西林)的剂量与疗程。

4.5.4 如何避免耐药株的产生 (1)严格掌握 *H pylori* 根除的适应证, 选用正规、有效的治疗方案。 (2)联合用药, 避免使用单一抗生素, 与胶体铋剂或 RBC 合用可以降低或避免 *H pylori* 的耐药性。 (3)加强基层医生对 *H pylori* 治疗知识的普及与更新。 (4)有条件的单位治疗前先做药物敏感试验, 避免使用对 *H pylori* 耐药的抗生素。 (5)不断开发治疗 *H pylori* 的新药, 包括中西医结合治疗。 (6)由于 *H pylori* 的耐药性, PPI 三联方案必要时可以使用 2 wk。 (7)对一线治疗失败者, 改用补救疗法或替代疗法时, 尽量避免使用咪唑类药物, 可改用其他药物, 如呋喃唑酮、胃内滞留型庆大霉素缓释片等。 (8)努力研究开发 *H pylori* 疫苗, 让 *H pylori* 感染的免疫防治变成现实。

4.6 中医药治疗

4.6.1 辨证论治

4.6.1.1 肝胃不和证 治则: 疏肝理气, 健脾和胃。方药: 柴胡疏肝散合五磨饮子加减(柴胡、炒白芍、炙甘草、枳壳、川芎、香附、沉香、郁金、青皮、川楝子)加减: 疼痛明显者加元胡, 三七粉^(冲服); 暖气明显者加沉香, 白蔻仁^(后下); 苔厚腻者加厚朴、薏苡仁; 伴反酸者加海螵蛸、浙贝母。

4.6.1.2 脾胃虚寒证 治则: 温中散寒, 健脾和胃。方药: 黄芪建中汤加味(黄芪、桂枝、白芍、高良姜、香附、广木香、炙甘草、生姜、大枣)加减: 吐清水明显者加姜半夏、陈皮、干姜; 反酸明显者加吴茱萸、乌贼骨、瓦楞子; 大便潜血阳性者加炮姜炭、白芨、仙鹤草、地榆炭。

4.6.1.3 胃阴不足证 治则: 健脾养阴, 疏肝益胃. 方药: 一贯煎合芍药甘草汤加减(沙参、麦冬、炒白芍、甘草、生地、玉竹、石斛、香橼、柴胡、生山楂) 加减: 大便干燥者加火麻仁、柏子仁; 反酸嘈杂者加瓦楞子、浙贝母; 神疲乏力者加黄芪、太子参; 舌红光剥者加玄参; 伴失眠者加酸枣仁、合欢皮.

4.6.1.4 寒热夹杂证 治则: 清补兼施, 寒热并用. 方药: 三黄泻心汤合理中丸加减或半夏泻心汤(黄芪、黄连、黄芩、白术、桂枝、白芍、炙甘草、陈皮、佛手、丹参、半夏、枳壳) 加减: 胃寒明显者加高良姜、香附; 胃脘痞满、纳呆者加干姜、砂仁; 反酸烧心等热象明显者煅瓦楞子、乌贼骨、浙贝母.

4.6.1.5 瘀血阻络者证 治则: 活血化瘀, 通络止痛; 方药: 失笑散合丹参饮加减(蒲黄、五灵脂、丹参、延胡索、三七粉^(冲服)、郁金、枳壳、川楝子) 加减: 兼气虚者加黄芪、党参; 泛酸者加海螵蛸、浙贝母; 瘀热者加赤芍、大黄.

4.6.2 中成药治疗

4.6.2.1 胃必宁片 能健脾和胃, 清热祛瘀. 适用于脾胃湿热兼气滞血瘀者, 5片, 4次/d; 也可用于溃疡病恢复期巩固治疗, 4片/次, 3次/d.

4.6.2.2 健胃愈疡片 能疏肝健脾, 理气止痛, 生肌愈疡, 适用于肝胃不和, 肝郁脾虚证, 4~6粒, 3次/d.

4.6.2.3 胃苏冲剂 适用于肝郁气滞证溃疡病, 1包, 2次/d, 口服.

4.6.2.4 胃热清胶囊 适用于胃热证溃疡病, 4粒,

3次/d, 口服.

4.6.2.5 胃乃安胶囊 适用于脾胃虚弱证溃疡病, 4粒, 3次/d, 口服.

4.6.2.6 金佛止痛丸 适用于肝气犯胃型溃疡病, 1粒, 3次/d, 口服.

4.6.2.7 四方胃片 适用于肝胃郁热型溃疡病, 4粒, 3次/d, 口服.

4.6.3 针灸疗法 主穴: 中脘、足三里、内关、胃俞、脾俞、肾俞. 配穴: 肝胃不和, 加肝俞、期门、膈俞、梁门、梁丘、阳陵泉, 用泻法. 饮食积滞者, 加梁门、下脘、天枢、脾俞、支沟, 用泻法、强刺激. 脾胃虚弱者, 加章门, 用补法, 另外加灸脾俞、胃俞、下脘、气海、关元、天枢. 胃阴不足者, 加三阴交、太溪, 用补法. 胃热者, 刺金津、玉液出血. 胃寒者, 主穴加灸. 瘀血阻络者加肝膈、期门、三阴交. 每日1次, 10d为1疗程.

5 巩固疗效防止复发

5.1 避免复发诱因 如精神紧张、刺激性饮食、过劳、受冻、饮酒、吸烟等均应尽量避免.

5.2 彻底解决并发症 如并发慢性胃炎、*H pylori*感染者必须彻底治疗根除之.

5.3 巩固治疗 溃疡治愈后应继续选用一种抑酸剂或黏膜保护剂低剂量继续治疗3mo以上.

5.4 根据中医辨证 以中药辨证论治结合西医西药治疗, 以巩固治疗, 预防复发.

溃疡性结肠炎中西医结合诊治方案

陈治水, 危北海, 张万岱

中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会

陈治水, 危北海, 张万岱. 溃疡性结肠炎中西医结合诊治方案. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2690-2693

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2690.asp>

编者按 溃疡性结肠炎中西医结合诊断、辨证和疗效标准试行方案已执行10 a, 近年本病的诊断和治疗有了很大的进展, 经过本专业委员会数十位专家的反复讨论, 现修改重订如下。

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称慢性非特异性溃疡性结肠炎, 系原因不明的大肠黏膜的慢性炎症和溃疡性病变, 临床以腹泻、黏液脓血便、腹痛为特征。中医属“泄泻”、“痢疾”、“便血”等范畴。

1 类型

1.1 西医分类

1.1.1 初发型 指无既往史而首次发作者。

1.1.2 慢性复发型 临床最为多见。症状较轻, 治疗后常有长短不一的缓解期, 与一般历时3-4 wk的发作期交替发生。

1.1.3 慢性持续型 首次发作后肠道症状持续数月或数年, 可伴有肠外症状, 期间可有急性发作。与慢性复发型相比, 此型结肠受累较广泛, 病变倾向于进行性。

1.1.4 急性暴发型 症状严重伴全身中毒症状, 可伴中毒性巨结肠、肠穿孔、脓毒血症等并发症。

注: 除暴发型外, 以上各型可相互转化。

1.2 中医证型

1.2.1 大肠湿热证

1.2.1.1 主要症候 (1)腹泻黏液脓血便。(2)里急后重。(3)舌苔黄腻。(4)脉滑数或濡数。

1.2.1.2 次要症候 (1)肛门灼热。(2)身热。(3)下腹坠痛或灼痛。(4)口苦, 口臭。(5)小便短赤。

1.2.1.3 证型确定 具备主证2项(第1项必备, 以下同)加次证2项, 或主证第1项加次证3项。

1.2.2 脾胃气虚证

1.2.2.1 主要症候 (1)腹泻便溏, 有黏液或少量脓血。(2)食少纳差。(3)食后腹胀。(4)舌质淡胖或有齿痕, 苔薄白。(5)脉细弱或濡缓。

1.2.2.2 次要症候 (1)腹胀肠鸣。(2)腹部隐痛喜按。(3)肢

体倦怠。(4)神疲懒言。(5)面色萎黄。

1.2.2.3 证型确定 具备主证2项加次证2项, 或主证第1项加次证3项。

1.2.3 脾肾阳虚证

1.2.3.1 主要症候 (1)久泻不愈, 大便清稀或伴有完谷不化。(2)腰膝酸软。(3)形寒肢冷。(4)食少纳差。(5)舌质淡胖或有齿痕, 苔白润。(6)脉沉细或尺脉弱。

1.2.3.2 次要症候 (1)五更泄或黎明前泻。(2)脐中腹痛, 喜温喜按。(3)腹胀肠鸣。(4)少气懒言。(5)面色㿔白。

1.2.3.3 证型确定 具备主证2项加次证2项, 或主证第1项加次证3项。

1.2.4 肝郁脾虚证

1.2.4.1 主要症候 (1)腹痛则泻, 泻后痛减, 大便稀烂或黏液便。(2)腹泻前有情绪紧张或抑郁恼怒等诱因。(3)胸胁胀闷。(4)舌质淡红, 苔薄白。(5)脉弦或弦细。

1.2.4.2 次要症候 (1)喜长叹息。(2)暖气不爽。(3)食少腹胀。(4)矢气较频。

1.2.4.3 证型确定 具备主证2项加次证2项, 或主证第1项加次证3项。

1.2.5 阴血亏虚证

1.2.5.1 主要症候 (1)大便秘结或带少量脓血。(2)总有便意, 但排便困难。(3)午后低热。(4)失眠盗汗。(5)舌红少苔。

1.2.5.2 次要症候 (1)心烦易怒。(2)头晕目眩。(3)腹中隐隐灼痛。(4)神疲乏力。(5)脉细数。

1.2.5.3 证型确定 具备主证2项加次证2项, 或主证第1项加次证3项。

1.2.6 血瘀肠络证

1.2.6.1 主要症候 (1)腹痛拒按, 痛有定处。(2)泻下不爽。(3)下利脓血、血色紫暗或黑便。(4)舌紫或有瘀点、瘀斑。(5)脉涩或弦。

1.2.6.2 次要症候 (1)肠鸣腹胀。(2)面色晦暗。(3)腹部有痞块。(4)胸胁胀痛。(5)肌肤甲错。

1.2.6.3 证型确定 具备主证2项加次证2项, 或主证舌象必备加次证2-3项。辨证说明: 证型确定以就诊当时的证候为准。具备两个证者称为复合证(两个证同等并存, 如脾肾阳虚与肝郁脾虚证)或兼证型(一个证为主, 另一个证为辅, 前者称主证, 后者称兼证, 如脾胃气虚兼湿热证)。

2 诊断标准

(参照中华医学会消化病学分会炎症性肠病诊断标准执行, 2000' 成都)。

2.1 临床表现 有持续或反复发作的腹泻、黏液脓血便伴腹痛、里急后重和不同程度的全身症状. 可有关节、皮肤、眼、口及肝胆等肠外表现.

2.2 结肠镜检查 病变多从直肠开始, 呈连续性、弥漫性分布, 表现为:

2.2.1 黏膜血管纹理模糊、紊乱、充血、水肿、易脆、出血及脓性分泌物附着. 亦常见黏膜粗糙, 呈细颗粒状.

2.2.2 病变明显处可见弥漫性多发糜烂或溃疡.

2.2.3 慢性病变者可见结肠袋囊变浅、变钝或消失, 假息肉及桥形黏膜等.

2.3 钡剂灌肠检查主要改变

2.3.1 黏膜粗乱及(或)颗粒样改变.

2.3.2 肠管边缘呈锯齿状或毛刺样, 肠壁有多发性小充盈缺损.

2.3.3 肠管短缩, 袋囊消失呈铅管样.

2.4 黏膜病理学检查有活动期与缓解期的不同表现

2.4.1 活动期

2.4.1.1 固有膜内弥漫性、慢性炎细胞及中性粒细胞、嗜酸性粒细胞浸润.

2.4.1.2 隐窝急性炎细胞浸润, 尤其上皮细胞及中性粒细胞浸润, 隐窝炎甚至形成隐窝脓肿, 可有脓肿溃入固有膜.

2.4.1.3 隐窝上皮增生, 杯状细胞减少.

2.4.1.4 可见黏膜表层糜烂, 溃疡形成, 肉芽组织增生.

2.4.2 缓解期

2.4.2.1 中性粒细胞消失, 慢性炎细胞减少.

2.4.2.2 隐窝大小形态不规则, 排列紊乱.

2.4.2.3 腺上皮与黏膜肌层间隙增大.

2.4.2.4 潘氏细胞化生.

2.5 手术切除标本病理检查可发现肉眼及组织学上 UC 的上述特点. 在排除细菌性痢疾、阿米巴痢疾、慢性血吸虫病、肠结核等感染性结肠炎及结肠 CD、缺血性结肠炎、放射性结肠炎等的基础上, 可按下列诊断标准诊断:

2.5.1 根据临床表现和肠镜检查三项中之一项及(或)黏膜活检支持, 可诊断本病;

2.5.2 根据临床表现和钡剂灌肠检查三项中之一项, 可诊断本病;

2.5.3 临床表现不典型而有典型结肠镜或钡剂灌肠改变者, 也可以临床拟诊为本病, 并观察发作情况;

2.5.4 临床上有典型症状或典型既往史而目前结肠镜或钡剂灌肠检查并无典型改变者, 应列为“疑诊”随访.

2.5.5 初发病例、临床表现和结肠镜改变均不典型者, 暂不诊断 UC, 可随访 3-6 mo, 观察发作情况.

2.5.6 完整的诊断应包括其临床类型、严重程度、病变范围、病情分期及并发症.

2.5.6.1 类型 初发型、慢性复发型、慢性持续型、暴发型.

2.5.6.2 临床严重程度分级 轻度: 患者腹泻每日 4 次以下, 便血轻或无, 无发热、脉搏加快或贫血, 血沉正常. 中度: 介于轻度和重度之间. 重度: 腹泻每日 6 次以上, 明显黏液血便, 体温在 37.5 °C 以上, 脉搏在 90 次/min 以上, 血红蛋白 < 100 g/L, 血沉 > 30 mm/h.

2.5.6.3 病变范围 可为直肠、直乙结肠、左半结肠、全结肠、区域性结肠受累.

2.5.6.4 病情分期 活动期、缓解期.

2.5.6.5 肠外表现及并发症 肠外可有关节、皮肤、眼部、肝胆等系统受累; 并发症可有大出血、穿孔、中毒性巨结肠、癌变等.

2.6 主要症状及肠黏膜病变轻重分级

主要症状及肠黏膜病变	一级(++)	二级(+++)	三级(++++)
腹泻	< 3 次/d	3-5 次/d	> 6 次/d
脓血便	少量脓血	中等量脓血	多量脓血或便新鲜血
腹痛	轻微、隐痛, 偶发	中等度, 隐痛或胀痛, 每日发作数次	重度, 剧痛或绞痛, 反复发作
肛门下坠	轻, 便后消失	中等, 便后略减轻	重, 便后不减
充血水肿	轻度	中等度	重度
糜烂	无或轻度	中等度可伴有出血	重度触之有明显出血
溃疡	无或散在分布 数量 < 3 个, 周边轻度红肿	散在分布数量 > 3 个 周边明显红肿	分布多表面布满脓苔 周边显著红肿

3 疗效评定标准

3.1 完全缓解 (1)临床主要症状消失, 次症消失或基本消失, 舌、脉基本恢复正常. (2)肠镜复查黏膜病变恢复正常, 或溃疡病灶已形成瘢痕. (3)便常规镜检 3 次正常.

3.2 显效 (1)临床主要症状基本消失, 次症改善程度达二级以上(3 + → +); 舌脉基本复常. (2)肠镜复查黏膜病变恢复程度达二级以上(3 + → + 或 ++ → 0). (3)便常规检查正常.

3.3 好转 (1)临床主要症状改善达一级以上(3 + → 2 + 或 2 + → +). (2)肠镜复查黏膜病变恢复程度达一级以上. (3)便常规镜检红、白细胞数 < 5 个/H.

3.4 无效 经治疗后临床症状、内镜及病理检查无改善.

4 治疗

4.1 治疗原则 溃疡性结肠炎的治疗目的是缓解症状、消除炎症、愈合溃疡、防止并发症和预防复发. 其治疗原则为整体治疗与肠道局部治疗、病因治疗与对症治疗、西医治疗与中医治疗相结合. 治疗方案主要根据疾病的严重程度、病变部位及其范围来确定.

4.2 治疗要点

4.2.1 轻-中度远段结肠炎患者可采用口服氨基水杨酸类制剂或中医辨证治疗, 局部应用 5-ASA 制剂或中药保留灌肠治疗; 无效时可将中西医内科治疗方法联合应

用.个别患者可局部用少量类固醇制剂.

4.2.2 轻-中度泛发性结肠炎患者应口服柳氮磺胺吡啶(SASP)或其他氨基水杨酸类制剂(5-ASA),同时应用中医辨证或中药专方制剂治疗,亦可结合直肠局部给药治疗.无效时可使用泼尼松口服(40-60 mg/d)治疗,仍无效者可选用嘌呤类药物或氨甲喋呤等免疫抑制剂.

4.2.3 难治性远段结肠炎宜首选中药锡类散配合类固醇制剂保留灌肠,可局部应用5-ASA灌肠剂,并延长直肠给药时间.

4.2.4 重症溃疡性结肠炎患者对口服泼尼松、氨基水杨酸类药物或局部治疗无效,或出现中毒症状者,应采用静脉皮质激素输注治疗7-10 d,并配合辨证应用中药.如无效,则应考虑做结肠切除术或进行环孢霉素静脉注射治疗.

4.2.5 当急性发作得到控制后,SASP、奥柳氮、马沙拉嗪、艾迪沙等对减少复发均有效,最好应用中药制剂配合2/3-1/2剂量的水杨酸类制剂以巩固治疗.患者不宜长期使用类固醇.硫唑嘌呤或6-MP可作为类固醇依赖性患者需减少类固醇剂量时的配合用药.

4.3 西医药治疗

4.3.1 活动期的处理

4.3.1.1 轻度UC的处理 可选用柳氮磺胺吡啶(SASP)制剂,0.75-1 g/次,3次/d,口服;或用相当剂量的5-氨基水杨酸(5-ASA)制剂.病变分布于远段结肠者可酌用SASP栓剂0.5-1 g/次,2次/d;氢化可的松琥珀酸钠盐灌肠液,100-200 mg/次,1次/晚,保留灌肠.或用相当剂量的5-ASA制剂灌肠.

4.3.1.2 中度UC的处理 可用上述制剂量水杨酸类制剂治疗,反应不佳者,适当加量或改口服皮质类固醇激素,常用泼尼松(强的松)30-40 mg/d,分次口服.

4.3.1.3 重度UC的处理 重度溃疡性结肠炎一般病变范围较广,病情发展变化较快,作出诊断后应及时处理,给药剂量要足,治疗方法如下:(1)如患者尚未用过口服类固醇至少可口服强的松龙40-60 mg/d,观察7-10 d,亦可直接静脉给药.已使用者应静脉滴注氢化可的松300 mg/d或甲基强的松龙48 mg/d,未用过类固醇激素者亦可用ACTH 120 mg/d,静脉滴注.(2)肠外应用广谱抗生素控制肠道继发感染,如氨苄青霉素、硝基咪唑及喹诺酮类制剂.(3)应使患者卧床休息,适当输液、补充电解质,以防水电平衡紊乱.(4)便血量大,血红蛋白(Hb)90 g/L以下和持续出血不止者应考虑输血.(5)营养不良,病情较重者可用要素饮食,病情严重者应予肠外营养.(6)静脉类固醇激素使用7-10 d后无效者可考虑环孢素静滴每天2-4 mg/kg.由于药物免疫抑制作用、肾脏毒性及其他不良反应,应严格监测血药浓度.因此,从医院监测条件综合考虑,主张在少数医学中心使用.亦可考虑其他免疫抑制剂,剂量及用法参考药典和教科书.(7)如上述药物治疗疗效不佳,应及时内、外科会诊,确定结肠切除手术的时机与方式.(8)慎用解痉

剂及止泻剂,以避免诱发中毒性巨结肠.(9)密切监测患者生命体征及腹部体征变化,及早发现和处理并发症.

4.3.2 缓解期的处理 症状缓解后,应继续维持治疗至少1a或长期维持.一般认为类固醇激素无维持治疗效果,在症状缓解后逐渐减量,应尽可能过渡到用SASP维持治疗.SASP的维持治疗剂量一般为口服1-3 g/d,亦可用相当剂量的新型5-ASA类药物.6-巯基嘌呤或硫唑嘌呤等用于对上述药物不能维持或对类固醇激素依赖者.

4.3.3 外科手术治疗

4.3.3.1 绝对指征 大出血、穿孔、明确的或高度怀疑癌肿以及组织学检查异型增生或肿块组织中出现轻中度异型增生.

4.3.3.2 相对指征 重度UC伴中毒性巨结肠,静脉用药无效者;内科治疗症状顽固、体能下降、对类固醇激素耐药或依赖者;或UC合并坏疽性脓皮病、溶血性贫血等肠外并发症者.

4.4 中医中药治疗

4.4.1 辨证论治

4.4.1.1 大肠湿热证 治则:清热化湿,调气行血.方药:芍药汤(芍药、黄芩、黄连、大黄、槟榔、当归、木香、肉桂).加减:大便脓血较多者加紫珠草、地榆;大便白冻黏液较多者加苍术、苡仁;腹痛较甚者加延胡索、乌药、枳实理气止痛;身热甚者加葛根.

4.4.1.2 脾胃气虚证 治则:健脾益气,除湿升阳.方药:参苓白术散(人参、茯苓、白术、桔梗、山药、白扁豆、莲子肉、砂仁、薏苡仁、甘草).加减:大便夹不消化食物者加神曲、枳实消食导滞;腹痛怕凉喜暖者加炮姜;寒甚者加附子温补脾肾;久泻气陷者加黄芪、升麻、柴胡升阳举陷;久泻不止者加赤石脂、石榴皮、乌梅、柯子涩肠止泻.

4.4.1.3 脾肾阳虚证 治则:健脾补肾,温阳化湿.方药:理中汤合四神丸(人参、干姜、白术、甘草、补骨脂、肉豆蔻、吴茱萸、五味子、生姜、大枣).加减:腹痛甚加白芍缓急止痛;小腹胀满加乌药、小茴香、枳实理气除满;大便滑脱不禁加赤石脂、柯子涩肠止泻.

4.4.1.4 肝郁脾虚证 治则:疏肝理气,健脾和中.方药:痛泻要方合四逆散(柴胡、芍药、枳实、陈皮、防风、白术、甘草).加减:排便不畅,矢气频繁者加枳实、槟榔理气导滞;腹痛隐隐,大便溏薄,倦怠乏力者加党参、茯苓、炒扁豆健脾化湿;胸胁胀痛者加柴胡、香附疏肝理气;夹有黄白色黏液者加黄连、白花蛇舌草清热解毒利湿.

4.4.1.5 阴血亏虚证 治则:滋阴养血,益气健中.方药:驻车丸合四君子汤加味(黄连、阿胶、当归、干姜、党参、白术、茯苓、甘草、白芍、乌梅、沙参、五味子).加减:虚坐努责者加柯子、石榴皮收涩固脱;五心烦热加银柴胡、鳖甲^(先煎)清虚热;便下赤白粘冻者加白花蛇舌草、秦皮清化湿热.

4.4.1.6 血瘀肠络证 治则:活血化瘀,理肠通络.方药:少腹逐瘀汤加味(当归、赤芍、红花、蒲黄、五灵

脂、延胡索、没药、小茴香、乌药、肉桂)加减: 腹满痞胀甚者加枳实、厚朴; 腹有痞块者加山甲珠、皂角刺; 腹痛甚者加三七末^[10]、白芍; 晨泄明显者加补骨脂。

4.4.2 中药灌肠治疗 中药保留灌肠一般将敛疮生肌、活血化瘀与清热解毒类药物配合应用。敛疮生肌类: 珍珠、牛黄、冰片、琥珀、儿茶等; 活血化瘀类: 蒲

黄、丹参、三七; 清热解毒类: 青黛、黄连、黄柏、白头翁、败酱草等。常用灌肠方有锡类散、溃结清(枯矾、赤石脂、炉甘石、青黛、梅花点舌丹)、溃结1号(牛黄、冰片、珍珠、青黛、儿茶)、青黛散(青黛、黄柏、儿茶、枯矾、珍珠)等。临床可将中药复方煎剂100 mL, 加锡类散2支, 奴夫卡因20 mL, 每晚灌肠1次。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 出版周期

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》将从2004年起由月刊改为半月刊, 以期在不增加出版篇幅的前提下进一步缩短出版周期, 力争论文的投稿时滞控制在1-4个月内出版, 并进入 Science Citation Index-Expanded 及 *Index Medicus* /MEDLINE 等国际著名检索系统, 以展示我国消化病学者在该领域的国际领先地位。例如, 2003年第10期刊出的浙江大学医学院附属第二医院普外科彭淑牖教授等撰写的“采用 PMOD 和刮吸术通过不同途径进行肝尾叶切除术: 76例”, 是一篇具有国际领先水平的论文, 该文从收稿至出版仅用45天。

World Journal of Gastroenterology 栏目设置

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》主要开设以下栏目。(1)文献综述: 基于作者自己研究为主的综述性论文。(2)特色栏目 如食管癌、胃癌、肝癌、病毒性肝炎、中医中药、中西医结合等, 具有我国特色及国际领先水平的原创性研究论文。(3)基础研究 报道学术价值高、实验数据完整、具有原始性和创新性的研究成果。(4)临床研究 报道安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验的临床研究论文。(5)研究快报 报道具有原始性和创新性的阶段性成果。(6)病例报告: 报道对临床工作者有指导意义的个案。

World Journal of Gastroenterology 稿件管理

为了加快《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》稿件管理的信息化、电子化进程, 提高办刊质量, 规范编辑工作流程, 提高工作效率, 我们成功开发了世界胃肠病学杂志社稿件管理系统, 并于2003-04-15投入使用, 来稿登记、稿件回执、稿件初审、二审(包括选择审稿专家和发送审稿通知书)、审稿意见、终审定稿、发送录用通知书、退稿、编辑加工、数据交换、网上投稿查询等, 全部实现了自动生成, 电子化处理。作者在WJG网上投稿查询系统内提交用户名(第一作者)和密码(文章编号)后可查询到稿件的处理状态, 如编号、刊名、题名、作者、收稿日期、送审日期、接受日期、退稿日期、发票编号、待发表日期、入卷(期)和出版页码等在内的28个项目。

肝硬化中西医结合诊治方案

危北海, 张万岱, 陈治水, 张育轩

中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会

编者按

本专业委员会于 1993-11 在洛阳召开的第五届学术交流会上制定的肝硬化临床诊断、中医辨证和疗效标准, 自 1994 年公布后执行了 10 a, 近年来经过专业委员会专家的多次反复讨论, 现重新修订如下:

危北海, 张万岱, 陈治水, 张育轩. 肝硬化中西医结合诊治方案. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2694-2696
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2694.asp>

0 引言

肝硬化(hepatic cirrhosis)是一种常见的由不同病因引起的肝脏慢性、进行性、弥漫性病变. 其特点是在肝细胞坏死的基础上纤维化, 并代之以纤维包绕的假小叶, 临床以肝功能损害和门脉高压为主要表现, 晚期常有大量腹水形成. 属于中医学“胁痛”、“积聚”、“徵积”、“鼓胀”范畴.

1 分类

1.1 西医分类

- 1.1.1 肝炎后肝硬化
- 1.1.2 胆汁淤积性肝硬化
- 1.1.3 酒精性肝硬化
- 1.1.4 血吸虫性肝硬化
- 1.1.5 心源性肝硬化
- 1.1.6 其他原因肝硬化

1.2 中医证型

- 1.2.1 肝气郁结证 (含肝胃不和、肝脾不调)
 - 1.2.1.1 主要症候 (1)胁肋胀痛或窜痛. (2)急躁易怒, 喜太息. (3)口干口苦, 或咽部有异物感. (4)脉弦.
 - 1.2.1.2 次要症候 (1)纳差或食后胃脘胀满. (2)便溏. (3)腹胀. (4)嗳气. (5)乳房胀痛或结块.
 - 1.2.1.3 证型确定 具备主证2项(第1项必备)加次证2项.
- 1.2.2 水湿内阻证
 - 1.2.2.1 主要症候 (1)腹胀如鼓, 按之坚满或如蛙腹. (2)肋下痞胀或疼痛. (3)脘闷纳呆, 恶心欲吐. (4)舌苔白腻或白滑.
 - 1.2.2.2 次要症候 (1)小便短少. (2)下肢浮肿. (3)大便溏薄. (4)脉细弱.
 - 1.2.2.3 证型确定 具备主证2项(第1项必备)加次证1项.
- 1.2.3 湿热蕴结证

- 1.2.3.1 主要症候 (1)目肤黄染, 色鲜明. (2)恶心或呕吐. (3)口干或口臭. (4)舌苔黄腻.
- 1.2.3.2 次要症候 (1)脘闷, 纳呆, 腹胀. (2)小便黄赤. (3)大便秘结或粘滞不畅. (4)胁肋灼痛. (5)脉弦滑或滑数.
- 1.2.3.3 证型确定 具备主证2项加次证2项.
- 1.2.4 肝肾阴虚证
 - 1.2.4.1 主要症候 (1)腰痛或腰酸腿软. (2)胁肋隐痛, 劳累加重. (3)眼干涩. (4)五心烦热或低烧. (5)舌红少苔.
 - 1.2.4.2 次要症候 (1)耳鸣、耳聋. (2)头晕、眼花. (3)大便干结. (4)小便短赤. (5)口干咽燥. (6)脉细或细数.
 - 1.2.4.3 证型确定 具备主证3项, 或主证2项加次证2项.
- 1.2.5 脾肾阳虚证
 - 1.2.5.1 主要症候 (1)腹部胀满, 入暮较甚. (2)脘闷纳呆. (3)阳痿早泄. (4)神疲怯寒. (5)下肢水肿.
 - 1.2.5.2 次要症候 (1)小便清长或夜尿频数. (2)大便稀薄. (3)面色萎黄或苍白. (4)舌质淡胖, 苔润. (5)脉沉细或迟.
 - 1.2.5.3 证型确定 具备主证3项加次证1项, 或主证2项加次证2项.
- 1.2.6 瘀血阻络证
 - 1.2.6.1 主要症候 (1)胁痛如刺, 痛处不移. (2)腹大坚满, 按之不陷而硬. (3)腹壁青筋暴露. (4)肋下积块(肝或脾肿大). (5)舌质紫暗, 或瘀斑瘀点. (6)唇色紫褐.
 - 1.2.6.2 次要症候 (1)面色黎黑或晦黯. (2)头、项、胸腹红点赤缕. (3)大便色黑. (4)脉细涩或扎. (5)舌下静脉怒张.
 - 1.2.6.3 证型确定 具备主证2项加次证1项.

2 诊断标准

2.1 诊断依据

2.1.1 主要指征

- 2.1.1.1 内镜或食管吞钡X线检查可见食管胃底静脉曲张.
- 2.1.1.2 B 超提示肝回声明显增强、不均、光点粗大; 或肝表面欠光滑, 凹凸不平或呈锯齿状; 或门静脉直径 ≥ 1.4 cm; 或脾脏增大, 脾静脉直径 ≥ 1.0 cm.
- 2.1.1.3 腹水, 伴腹壁静脉怒张.
- 2.1.1.4 CT 显示肝外缘结节状隆起, 肝裂扩大, 尾叶/右叶比例 >0.05 , 脾大.
- 2.1.1.5 腹腔镜或肝穿刺活组织检查诊为肝硬化.

以上除(5)外, 其他任一项结合部分次要指征, 可以确诊.

2.1.2 次要指征

- 2.1.2.1 体征 肝病面容(脸色晦黯无华), 可见多个蜘蛛痣.

蛛痣,肝掌,黄疸,下肢水肿,肝脏质地偏硬,脾大,男性乳房发育。

2.1.2.2 化验 一般肝功能异常(血清白蛋白含量下降, A/G 倒置,血清胆红素升高,凝血酶原时间延长等),或血清透明质酸(HA)、IV型胶原(IV-C)、III型前胶原肽(P III P)、层粘连蛋白(LN)增高。

以上所列化验指标及体征不必悉备。

2.2 病因诊断依据

2.2.1 肝炎后肝硬化需有 HBV-M(任何一项)或 HCV-M(任何一项)阳性,或有明确重症肝炎病史。

2.2.2 酒精性肝硬化需有长期大量嗜酒史(80 g/d, 10 a 以上)。

2.2.3 血吸虫性肝硬化需有慢性血吸虫病史。

2.2.4 其他病因引起的肝硬化需有相应的病史及诊断,如长期右心衰竭或下腔静脉阻塞,长期使用损肝药物,自身免疫性疾病,代谢障碍性疾病等。

2.3 分期和分级判断依据

2.3.1 分期 分代偿期和失代偿期。凡具有较明显的肝功能损害(血浆白蛋白降低,直接胆红素升高,凝血酶原时间延长等)及门脉高压表现(脾肿大,脾功能亢进,腹水等)者,可定为失代偿期。

2.3.2 分级 按 Child(Child-pugh)评分分级。

项目	1分	2分	3分
白蛋白(g/L)	>35	28-35	<28
胆红素(μ mol/L)	<34	34-51	>51
凝血酶原时间(活动度 %)	>50	30-50	<30
腹水	无	轻度	中-重度
肝性脑病	无	1-2级	3-4级

A级:总分5-6分;B级:总分7-9分;C级:总分 \geq 10分。

3 疗效判定标准

3.1 显效 疗程(3 mo)结束时,(1)症状完全消失,一般情况良好。(2)肝脾肿大稳定不变,无叩痛及压痛,有腹水者腹水消失。(3)肝功能(ALT、胆红素、A/G或蛋白电泳)恢复正常。(4)以上3项指标保持稳定1/2-1 a。

3.2 好转 疗程结束时,(1)主要症状消失或明显好转。(2)肝脾肿大稳定不变,无明显叩痛及压痛,有腹水者腹水减轻50%以上而未完全消失。(3)肝功能指标下降幅度在50%以上而未完全正常。

3.3 无效 未达好转标准或恶化者。

单项肝功能指标的疗效判定,同显效、好转、无效中有关规定。

4 治疗

4.1 治疗原则 肝硬化的治疗应该中西医结合综合性治疗。首先应针对病因进行治疗,如酒精性肝硬化者必须戒酒;代偿期乙型及丙型肝炎肝硬化者可抗病毒治疗。肝

硬化早期应积极用中药抗纤维化治疗,晚期应针对并发症治疗。

4.2 一般治疗 代偿期患者应适当减少活动,注意劳逸结合,可参加轻工作;失代偿期的患者应卧床休息为主。饮食以易消化、富含蛋白质和维生素的食物为宜;有腹水时应少盐或无盐;禁酒;避免进食粗糙、坚硬食物;禁用损害肝脏的药物。

4.3 中医中药治疗

4.3.1 辨证论治

4.3.1.1 肝气郁结证 治则:疏肝理气。方药:柴胡疏肝汤加减。(柴胡、白芍、枳壳、香附、川芎、陈皮、炙甘草)加减:兼脾虚证者加四君子汤;伴有苔黄,口干苦,脉弦数,气郁化热者加丹皮、栀子;伴有头晕、失眠,气郁化热伤阴者加制首乌、枸杞、白芍;肋下刺痛不移,面青、舌紫者加元胡、丹参;精神困倦,大便溏,舌质白腻,质淡体胖,脉缓,寒湿偏重者加干姜、砂仁。

4.3.1.2 水湿内阻证 治则:运脾化湿,理气行水。方药:实脾饮加减(白术、熟附子、干姜、木瓜、大腹皮、茯苓、厚朴、木香、草果、薏苡仁、车前子、甘草)。加减:水湿过重者加肉桂、猪苓、泽泻;气虚明显者加人参、黄芪;胁满胀痛加郁金、青皮、砂仁。

4.3.1.3 湿热蕴结证 治则:清热利湿,攻下逐水。方药:中满分消丸合茵陈蒿汤加减(黄芩、黄连、知母、厚朴、枳实、陈皮、茯苓、猪苓、泽泻、白术、茵陈蒿、栀子、大黄、牵牛子^(研末冲)、甘草)加减:热毒炽盛,黄疸鲜明者加龙胆草、半边莲;腹胀甚,大便秘结者加商陆;小便赤涩不利者加陈葫芦、马鞭草;热迫血溢,吐血、便血者,去厚朴,加水牛角,生地,丹皮,生地榆;昏迷属热入心包者鼻饲安宫牛黄丸。

4.3.1.4 肝肾阴虚证 治则:滋养肝肾,活血化瘀。方药:一贯煎合膈下逐瘀汤加减(生地、沙参、麦冬、阿胶^(烔)、牡丹皮、当归、赤白芍、枸杞子、川楝子、丹参、桃仁、红花、枳壳)加减:内热口干,舌红少津者加天花粉、玄参;腹胀明显者加莱菔子、大腹皮;阴虚火旺者加知母、黄柏;低热明显者加青蒿、地骨皮;鼻衄甚者加白茅根、旱莲草。

4.3.1.5 脾肾阳虚证 治则:温补脾肾。方药:附子理中丸合五苓散,或《济生》肾气丸合五苓散加减(熟附子、干姜、党参、白术、猪苓、茯苓、泽泻、猪苓)。偏于脾阳虚者用附子理中丸合五苓散。偏于肾阳虚者用《济生》肾气丸合五苓散。加减:腹部胀满,食后较甚,在附子理中丸合五苓散基础上加木香、砂仁、厚朴;如面色灰暗,畏寒神疲,脉细无力可在《济生》肾气丸合五苓散基础上加巴戟天、仙灵脾;如腹壁青筋显露加赤芍、桃仁。

4.3.1.6 瘀血阻络证 治法:活血行气,化瘀软坚。方药:膈下逐瘀汤加减(当归、川芎、赤芍、桃仁、红花、丹参、乌药、延胡索、牡蛎、郁金、炒五灵脂、枳壳)。加减:瘀积明显者加炮山甲、蟅虫、水蛭;腹水明显者

加葶苈子、瞿麦、槟榔、大腹皮;若兼见气虚者加白术、人参、黄芪;兼见阴虚者加鳖甲^(研末冲服)、石斛、沙参等;兼见湿热者加茵陈、白茅根等。

4.3.2 中成药治疗

4.3.2.1 十枣丸 1.5-3 g,晨起空腹温开水冲服,适用于腹胀水饮内聚之实证,得快利后止服。

4.3.2.2 大温中丸 6-9 g,2-3次/d,口服,姜汤送服,适用于腹胀证属脾虚湿盛者。

4.3.2.3 大黄蟅虫丸 6 g,3次/d,口服,适用于瘀血阻络证,正气不虚者。

4.3.2.4 鳖甲煎丸 6 g,3次/d,口服,适用于肝脾血瘀证,正气不虚者。

4.3.2.5 鳖甲软肝片 4片,3次/d,口服,适用于肝脾血瘀证。

4.3.2.6 扶正软肝胶囊 4粒,3次/d,口服,适用于肝脾血瘀证,兼正气虚弱者。

4.3 针灸治疗

4.3.1 肝气郁结证 选期门、内关、太冲,用泻法;兼水湿内停加阳陵泉、水分、气海,平补平泻。

4.3.2 脾虚湿盛证 选脾腧、中脘、足三里、阴陵泉、水分,平补平泻。

4.3.3 脾肾阳虚证 选脾腧、肾腧、水分、足三里、气海,平补平泻。

4.3.4 肝肾阴虚证 选肝腧、肾腧、阴陵泉、三阴交、足三里,平补平泻。

4.4 西药治疗 保肝和抗病毒治疗,腹水的处理,食管-胃静脉破裂出血的处理,肝性脑病和肝肾综合征的处理,脾功能亢进及继发性感染的处理,可参见《实用内科学》第11版肝硬化有关章节进行处理。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

CAB Abstracts 和 Global Health 收录 World Journal of Gastroenterology

本刊讯 CAB International 对 WJG 仔细评阅,发现 WJG 报到的范围与 CAB International 兴趣范围一致,因此 CAB International 将 WJG 收录在 CAB Abstracts 和 Global Health 的索引内. CAB International 是一个非盈利的政府之间的组织,致力于全球范围传播知识. CAB 覆盖全球的优秀杂志,全球数据库的用户能够获得全文.(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

World Journal of Gastroenterology 发行

《World Journal of Gastroenterology, WJG》2003年印刷版共发行 973 份,其中国内邮局征订 168 份,分布在 27 个省市自治区;国外发行 105 份,分布在 56 个国家和地区;向承担国家 973 和 863 及国家自然科学基金项目负责人赠送 700 份.让更多的国际胃肠病学和肝病学专家阅读和使用 WJG 发表的具有我国特色及国际先进水平的学术论文, WJG 向美国胃肠病学会会员,美国肝病学会会员,美国癌症研究会会员免费提供每期的全文电子版,目前每期电子版的发行量已达 21200 份。

慢性胃炎的中西医结合诊治方案

张万岱, 陈治水, 危北海

中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会

张万岱, 陈治水, 危北海. 慢性胃炎的中西医结合诊治方案. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2697-2700

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2697.asp>

0 引言

慢性胃炎(chronic gastritis)是指不同病因引起的胃黏膜的慢性炎症或萎缩性病变. 属中医的“胃脘痛”、“胃痛”、“痞满”范畴.

1 临床表现

1.1 症状 无特异性, 多数有中上腹不适、饱胀、钝痛、烧灼痛, 无明显节律性, 一般进食后较重. 其次食欲不振、嗝气、泛酸、恶心等消化不良症状也较常见. 有相当一部分患者可无临床症状. 有胃糜烂者可有少量或大量上消化道出血, 长期少量出血可引起缺铁性贫血. 萎缩性胃炎伴恶性贫血者常有全身衰弱、疲惫、神情淡漠、隐性黄疸, 一般消化道症状较少.

1.2 体征 多不明显, 有时上腹轻压痛, 胃体胃炎严重时可有舌炎和贫血.

2 类型

2.1 西医分类

2.1.1 浅表性(非萎缩性)

2.1.2 萎缩性 自身免疫性; 多灶萎缩性.

2.1.3 特殊性: 详见附录 I

2.2 中医证型

2.2.1 肝胃不和证

2.2.1.1 主要症候 (1)胃脘胀痛或痛窜两胁. (2)嗝气频繁. (3)嘈杂泛酸. (4)脉弦.

2.2.1.2 次要症候 (1)胃黏膜急性活动性炎症. (2)胆汁反流. (3)舌质淡红, 苔薄白.

2.2.1.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 1 项, 或主证第 1 项加次证 2 项.

2.2.2 脾胃虚弱(含虚寒)证

2.2.2.1 主要症候 (1)胃脘隐痛. (2)喜按喜暖. (3)食后脘闷. (4)纳呆少食. (5)便溏腹泻. (6)四肢疲乏无力. (7)舌质淡红, 有齿印, 苔薄白或白.

2.2.2.2 次要症候 (1)胃黏膜可见红斑或粗糙不平. (2)黏液稀薄而多或线糊状. (3)胃酸偏低. (4)脉沉细.

2.2.2.3 证型确定 具备主证 3 项加次证 1 项, 或主证

2 项加次证 2 项.

2.2.3 脾胃湿热证

2.2.3.1 主要症候 (1)胃脘灼热胀痛. (2)口苦口臭. (3)脘腹痞闷, 渴不欲饮. (4)舌质红, 边尖深红, 苔黄厚或腻.

2.2.3.2 次要症候 (1)胃黏膜急性活动性炎症、充血糜烂明显. (2)小便黄. (3)脉滑或濡数.

2.2.3.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 1 项.

2.2.4 胃阴不足证

2.2.4.1 主要症候 (1)胃脘灼热疼痛. (2)口干舌燥. (3)大便干燥. (4)舌红少津无苔或剥苔或有裂纹.

2.2.4.2 次要症候 (1)胃黏膜呈颗粒状或血管显露. (2)胃黏膜干燥, 黏液少或胃酸偏低. (3)黏膜充血水肿或小糜烂. (4)脉细数或弦细.

2.2.4.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 1 项, 或主证 1 项加次证 2 项.

2.2.5 胃络瘀阻证

2.2.5.1 主要症候 (1)胃脘痛有定处, 不喜按或拒按. (2)大便潜血阳性或黑便. (3)舌质暗红或紫暗, 有瘀点或红斑.

2.2.5.2 次要症候 (1)胃痛日久不愈. (2)胃黏膜充血肿胀, 伴瘀斑或出血点. (3)脉缓弦涩.

2.2.5.3 证型确定 具备主证 2 项, 或主证第 1 项加次证 2 项.

2.2.6 脾虚气滞证

2.2.6.1 主要症候 (1)胃脘胀满或胀痛, 胃有闷塞感. (2)食少纳差, 食后腹胀. (3)嗝气频发.

2.2.6.2 次要症候 (1)大便时溏时结. (2)面色萎黄. (3)神疲乏力. (4)舌体胖、质淡红、苔薄白. (5)脉沉缓或沉细.

2.2.6.3 证型确定 具备主证 2 项加次证 1 项, 或主证第 1 项加次证 2 项.

3 诊断标准

3.1 临床诊断要点

3.1.1 病史、症状、体征及可能的病因和诱因

3.1.2 内镜诊断依据 浅表性胃炎: 红斑(点、片状、条状), 黏膜粗糙不平、出血点/斑; 萎缩性胃炎: 黏膜呈颗粒状, 黏膜血管显露, 色泽灰暗, 皱襞细小. 如同时存在平坦糜烂、隆起糜烂或胆汁反流, 则诊断为浅表性胃炎或萎缩性胃炎伴糜烂或伴胆汁反流.

3.1.3 *H pylori*相关性慢性胃炎的诊断 证实有 *H pylori* 现症感染(组织学、尿素酶、细菌培养、¹³C 或 ¹⁴C 尿素呼气试验任一项阳性), 病理切片检查有慢性胃炎组织学改变者, 即可诊断. 诊断内容包括胃炎类型、分布

范围(胃窦、胃体和全胃)、中医证型,对病因也应尽可能描述。例如:浅表性胃炎伴糜烂,胃窦为主,脾胃湿热证, *H pylori* 阳性。

3.2 病理组织学诊断 包括部位特征和形态学变化(*H pylori*、慢性炎症、活动性、萎缩、肠化等)及程度(分成无、轻、中、重度4级),如有异型增生要注明并分为轻、中、重度3级。有病因可循的要报告病因。详见附录I。

4 疗效判定标准

4.1 近期临床治愈 包括以下指标: (1)临床主要症状消失,次要症状基本消失或消失。(2)胃镜复查活动性炎症消失,慢性炎症好转达轻度。(3)活检组织病理证实胃镜所见,腺体萎缩、肠化和异型增生消退或消失。(4)胃酸基本恢复正常,胆汁反流消失。

4.2 显效 (1)临床主要症状消失,次要症状基本消失。(2)胃镜复查黏膜急性炎症基本消失,慢性炎症好转。(3)活检组织病理证实胃镜所见,腺体萎缩、肠化和异型增生恢复或减轻达两个级度以上(含两个级度)。(4)胃酸分泌功能和胆汁反流改善,原异常值减少2/3以上。

4.3 有效 (1)主要症状明显减轻。(2)胃镜检查黏膜病变范围缩小1/2以上,炎症有所减轻。(3)活检组织病理证实胃镜所见,急、慢性炎症减轻一个级度以上,腺体萎缩、肠化和异型增生减轻。(4)胃酸分泌功能和胆汁反流改善,原异常值减少1/2以上。

4.4 无效 未达到有效标准。

5 治疗

5.1 一般治疗

5.1.1 精神心理治疗 精神因素与慢性胃炎的发病有明显关系。重视患者的精神状态,正确说明病情,帮助其调整精神情绪,确立积极健康的生活态度等在慢性胃炎的治疗中都有极其重要的意义。

5.1.2 饮食治疗 宜选择易消化、无刺激性的食物,避免吸烟、酗酒、咖啡、浓茶,进食宜细嚼慢咽。

5.1.3 安慰治疗 如果无临床症状,胃镜及活检病理发现的轻度炎症及微小糜烂可能属于胃黏膜更新的正常范围,无需特殊治疗,应尽量向患者解释清楚,消除其疑虑。

5.2 抑酸剂 适用于黏膜糜烂或以烧心、反酸、上腹饥饿痛等症状为主者。可根据病情或症状严重程度选用制酸剂或H₂受体阻断剂(西米替丁、雷尼替丁、法莫替丁、尼扎替丁等),质子泵抑制剂(奥美拉唑、兰索拉唑、贲托拉唑、雷贝拉唑、埃索美拉唑等)。

5.3 根除 *H pylori* 治疗 适用于(1)有明显异常(胃黏膜糜烂、中重度萎缩、中重度肠化、异型增生)的慢性胃炎;(2)有胃癌家族史者;(3)伴糜烂性十二指肠炎者;(4)消化不良症状经常规治疗疗效差者。常用方案为铋剂加两种抗生素、质子泵抑制剂或枸橼酸铋雷尼替丁(RBC)加两种抗生素组成的三联疗法。详见附录II。

5.4 黏膜保护剂 适用于胃黏膜糜烂、出血或症状明显者。常用的药物有铋剂(德诺、丽珠得乐、迪乐、果胶铋、必诺等)、硫糖铝、米索前列醇(喜克溃)、麦滋林、施维舒、醋氨己酸锌等。

5.5 促动力剂 适用于上腹饱胀、早饱、嗝气等症状为主者,常用药物有吗丁啉、西沙比利、莫沙比利、曲美布汀等。

5.6 助消化药 适用于萎缩性胃炎、胃酸偏低,或食滞、纳差等症状为主者,常用药物有胃蛋白酶、酵母片、多酶片、稀盐酸、得每通等。

5.7 其他 抗抑郁药和镇静药适用于睡眠差、有明显精神因素者。

5.8 中医中药治疗

5.8.1 辨证论治

5.8.1.1 肝胃不和证 治则:疏肝理气,和胃解郁。方药:柴胡疏肝散加减(柴胡、白芍、枳壳、川芎、香附、陈皮、佛手、苏梗、延胡索、甘草)。加减:偏寒者加高良姜或乌药;偏热者加川黄连或山栀子;胀甚者加广木香、砂仁;吞酸者加煅乌贼骨、瓦楞子、浙贝母;痛甚者加金铃子。

5.8.1.2 脾胃虚弱证 治则:温中健脾,益气和胃。方药:香砂六君子汤合黄芪建中汤加减(党参、茯苓、白术、陈皮、广木香、砂仁、黄芪、桂枝、白芍、生姜、甘草)。加减:腹胀便溏者加炒扁豆、薏苡仁、莲子肉;食后腹胀、嗝气者加香橼、佛手、炒三仙;泛吐清水者加姜半夏、草豆蔻;寒气盛者加良附丸或干姜、肉桂。

5.8.1.3 脾胃湿热证 治则:清热化湿,和中醒脾。方药:三仁汤合连朴饮加减(黄连、黄芩、白蔻仁、蒲公英、生薏苡仁、法半夏、茯苓、厚朴、甘草)。加减:胃痛甚者加延胡索、金铃子、郁金;大便不爽者加大黄、枳实;恶心、呕吐者加竹茹、生姜、佩兰;纳呆者加鸡内金、谷芽、麦芽。

5.8.1.4 胃阴不足证 治则:养阴益胃,和络止痛。方药:一贯煎合芍药甘草汤加减(北沙参、太子参、麦冬、生地、栀子、当归、金铃子、白芍、甘草、绿萼梅、八月扎、香橼皮、鸡内金)。加减:口干甚、舌红赤者加天花粉、石斛;大便干结者加玄参、火麻仁;纳呆者加谷芽、麦芽、乌梅、山楂。

5.8.1.5 胃络瘀阻证 治则:活血化瘀,行气止痛。方药:失笑散合丹参饮加减(五灵脂、蒲黄、丹参、檀香^(后下)、砂仁、三七粉^(冲服)、延胡索、郁金、枳壳、炒莪术)。加减:偏实热者可加大黄、金铃子;偏寒者加肉桂、乌药;兼气虚者加黄芪、党参;阴虚者加生地、白芍、百合;黑便者加血余炭、阿胶^(烔)。

5.8.1.6 脾虚气滞证 治则:健脾理气,活血化瘀。方药:四君子汤合四逆散加减(柴胡、白芍、枳壳、党参、白术、茯苓、郁金、蒲黄、五灵脂、九香虫、丹参、甘草)。加减:痛甚者加延胡索、皂角刺;偏寒者加肉桂、乌药;空腹痛伴泛酸者加乌贼骨、浙贝母;腹胀疼满,嗝气频繁者加厚朴、苏梗、香附;大便秘结者加桂枝、炮姜;大便秘结者以枳实易枳壳,加莱菔子、槟榔片、

肉苁蓉。

5.8.2 中成药治疗 针对慢性胃炎,特别是萎缩性胃炎的病因病理,运用健脾益气、清热解毒、活血化瘀等治则,制成固定方中成药,如三九胃泰、胃复春、胃炎康、胃萎康、摩罗丹、温胃舒、养胃舒、荆花胃康胶丸、健胃愈疡片、胃力康、气滞胃痛冲剂、舒肝健胃冲剂、六味能消、六味安消等。

5.8.3 针灸治疗 取穴足三里、肝俞、胃俞针灸或向穴位注射黄芪、当归注射液对机体免疫功能有双相调节作用,有利于保护胃黏膜、逆转肠化和防止癌变。

5.9 手术治疗适应证 慢性萎缩性胃炎伴重度不典型增生或重度大肠型肠腺化生。

附录I 慢性胃炎的病理诊断标准和分类

1 活检取材

1.1 用于研究时,希望根据悉尼系统的要求取5块标本,胃窦2块取自距幽门2~3 cm处的大弯和小弯;胃体2块取自距贲门8 cm处的大弯和小弯(约距胃角近侧4 cm);胃角1块。对可能或肯定存在的病灶要另取标本。标本要足够大,达到黏膜肌层。

1.2 用于临床时,建议取2~3块标本,胃窦小弯1块(和大弯1块)及胃体小弯1块。

1.3 不同部位的标本须分开装瓶。

1.4 须向病理科提供取材部位、内镜所见和简要病史。

2 特殊染色

2.1 对炎症明显而HE染色片上未见 *H pylori* 的标本,要作特殊染色仔细寻找。可用较简便的Giemsa染色或Warthin-Starry染色。

2.2 对于肠化如认为有必要,可作AB-PAS和HID-AB染色。

3 组织学分级标准

3.1 有5种形态学变量要分级(*H pylori*、慢性炎症、活动性、萎缩和肠化),分成无、轻度、中度和重度4级(或0、+、++、+++),分级方法如下:

3.1.1 *H pylori*: 观察胃黏膜黏液层、表面上皮、小凹上皮和腺管上皮表面的 *H pylori*。无:特殊染色片上未见 *H pylori*;轻度:偶见或小于标本全长1/3有少数 *H pylori*;中度: *H pylori* 分布超过标本全长1/3而未达2/3或连续性、薄而稀疏地存在于上皮表面;重度: *H pylori* 成堆存在,基本分布于标本全长。肠化黏膜表面通常无 *H pylori* 定植,故标本全长中要扣除肠化区。

3.1.2 活动性 慢性炎症背景上有中性粒细胞浸润。轻度:黏膜固有层有少数中性粒细胞浸润;中度:中性粒细胞较多存在于黏膜层,可见于表面上皮细胞、小凹上皮细胞或腺管上皮间;重度:中性粒细胞较密集,或除中度所见外还可见小凹脓肿。

3.1.3 慢性炎症 根据慢性炎症细胞的密集程度和浸润深度分级,两可时以前者为主。正常:单个核细胞每高倍视野不超过5个,如数量略超过正常而内镜下无明显异常,病理可诊断为无明显异常;轻度:慢性炎症细胞较少并局限于黏膜浅层,不超过黏膜层的1/3;中度:慢性炎症细胞较密集,占据黏膜全层的1/3,达到2/3;重度:慢性炎症细胞密集,占黏膜全层。计算密度程度时要避开淋巴滤泡及其周围的小淋巴细胞区。

3.1.4 萎缩 指胃的固有腺体减少,幽门腺萎缩是指幽门腺减少或由肠化腺体替代,胃底(体)腺萎缩是指胃底(体)腺假幽门腺化生、肠化或腺体本身减少。轻度:固有腺体数减少不超过原有腺体的1/3,大部分腺体仍保留;中度:固有腺体数减少超过1/3,但未超过2/3,残存腺体分布不规则;重度:固有腺体数减少超过2/3,仅残留少数腺体,甚至完全消失。标本过浅未达黏膜肌层者不能诊断为萎缩,要剔除。胃窦部少数淋巴滤泡不算萎缩,但胃体黏膜层出现淋巴滤泡要考虑萎缩。

3.1.5 肠化 肠化部分占腺体和表面上皮总面积1/3以下为轻度;1/3~2/3为中度;2/3以上为重度。其他组织学特征:分为非特异性和特异性两类,不需要分级,出现时要注明。前者包括淋巴滤泡、小凹上皮增生、胰腺化生和假幽门腺化生等;后者包括肉芽肿、集簇性嗜酸性粒细胞浸润、明显上皮内淋巴细胞浸润和特异性病原体等。假幽门腺化生是胃底腺萎缩的指标,判断时要核实取材部位。

3.2 异型增生要分轻度、中度、重度三级。

3.2.1 轻度异型增生 胃黏膜结构和上皮细胞的异形性很轻微的异型增生,肯定是良性病。

3.2.1.1 腺管结构呈轻度不规则,形状不整,迂曲,排列紊乱和疏密不均。

3.2.1.2 再生型异型增生仅限于黏膜浅部,隐窝型则见于黏膜深层。

3.2.1.3 在胃型,其上皮细胞呈高柱状,胞质中残存黏液分泌物,甚至保存着正常的状态。在肠型,则杯状细胞减少。

3.2.1.4 核长圆型或杆状,体积增大,深染。

3.2.1.5 核排列较密集,位于细胞基底。轻度异型增生与单纯性增生之区别是后者仅为胃小凹及腺颈部上皮的增生和腺管伸长,但排列尚整齐,与黏膜表面大致呈垂直状态。上皮细胞分化成熟,无异型性。单纯性增生常见于萎缩伴增生性胃炎。

3.2.2 中度异型增生 是黏膜结构和细胞异型性较明显者,但仍为良性。

3.2.2.1 腺管结构不规则,形状大小不等,腺管迂曲。

3.2.2.2 腺管呈分枝状,排列较细密。

3.2.2.3 常呈一定的病灶性状,并且与周围组织有较清楚之界限,病变深部常见囊状扩张的腺管,或为异型增生的腺管,或为残存的原有胃腺,腺瘤型异型增生多属此级。

表1 慢性胃炎分类

胃炎类型	病因	胃炎同义语
浅表性(非萎缩性)	<i>H pylori</i> 其他因素?	慢性胃炎 炎间质性 / 滤泡性 高分泌性 糜烂性
萎缩性		
自身免疫性	自身免疫	A型胃炎, 胃萎缩 弥漫胃体性 恶性贫血相关性
多灶萎缩性	<i>H pylori</i> 饮食因素, 环境因素?	B型胃炎 化生性 弥漫胃窦萎缩性
特殊型		
化学性	化学性刺激, 胆汁性, NSAIDs, 其他因素?	反应性, 反流性, NSAID 性
放射性	射线损伤	
淋巴细胞性	原发性? 免疫反应性	痘疹样(或疣状)胃炎(内镜下)
	麦胶	乳糜泻相关性
	药物性	
	<i>H pylori</i> ?	
非感染性	Crohn 病	
肉芽肿性	结节病 Wegener 肉芽肿和	
	其他血管炎病, 异物性, 原发性	孤立肉芽肿性
嗜酸性细胞性	食物过敏, 其他过敏源?	过敏性
其他感染性疾病	细菌(非 <i>H pylori</i>) 蜂窝织炎性病毒, 霉菌, 寄生虫	

病理检查要报告每块活检标本的组织学变化情况。萎缩性胃炎的病理诊断标准暂定为: 同一部分(胃窦或胃体, 胃角标本作胃窦计算)的2块或2块以上活检标本都有萎缩和/或肠化时可诊断为萎缩性胃炎; 如仅1块标本有萎缩和/或肠化, 应诊断为“慢性胃炎伴萎缩和/或肠化”。

3.2.2.4 上皮细胞呈柱状, 杯状细胞甚少或仅见痕迹, 几乎不见潘氏细胞。

3.2.2.5 核呈长圆或杆状, 增大并浓染。

3.2.2.6 核排列密集, 虽然基本上位于细胞基底, 但排列稍显紊乱。日本胃癌研究会的第三群“境界领域病变”相当于此级, 但其原意是由轻度到重度的连续性病变中, 除去轻度异型增生和癌及可疑癌以外的中间范围的异型增生。

3.2.3 重度异型增生 结构及细胞异型性非常明显或判定良性恶性困难者均属此级, 在切除的胃标本或胃黏膜活检标本上, 常常很难与高分化微小癌鉴别。

3.2.3.1 腺管结构明显紊乱, 腺管之形态及大小不整, 可见到“背靠背”或“共壁”现象, 也可见分支或“出芽”现象。

3.2.3.2 如果是灶性, 表面常呈锯齿形。

3.2.3.3 常常达黏膜全层, 不一定残存有深部的囊状扩张腺管。

3.2.3.4 上皮细胞呈高柱状(肠型)或立方型、不定型(胃型), 前者不见杯状细胞或潘氏细胞, 后者分泌功能消失。

3.2.3.5 核比例增大, 浓染或疏松网状, 核仁明显。

3.2.3.6 核呈杆状或类圆形, 排列参差不齐, 可见核分裂象。

4 病理诊断报告

诊断应包括部位特征和形态学变化程度, 有病因可循的要报告病因。胃窦和胃体都有炎症的慢性胃炎不再称全胃炎, 称慢性胃炎即可; 但当胃窦和胃体炎症程度相差两级或以上时, 应加上“为主”修饰, 例如“慢性(活

动性)胃炎, 胃窦为主”。慢性胃炎有许多同义词, 应统一使用慢性胃炎分类表左侧的名称如下(表1)。

附录 II: 推荐的根除 *H pylori* 治疗方案

1 一线方案

1.1 PPI/RBC(标准剂量)+ A(1.0 g)+ C(0.5 g)2次/d × 7 d.

1.2 PPI/RBC(标准剂量)+ M(0.4 g)+ C(0.5 g)2次/d × 7 d.

1.3 PPI/RBC(标准剂量)+ A(1.0 g)+ F(0.1 g)/M(0.4 g)2次/d × 7 d.

1.4 B(标准剂量)+ F(0.1 g)/M(0.4 g)+ C(0.5 g)2次/d × 7 d.

1.5 B(标准剂量)+ M(0.4 g)+ T(0.75-1.0 g)2次/d × 14 d.

1.6 B(标准剂量)+ M(0.4 g)+ A(0.5 g)2次/d × 14 d.

从经济状况出发也可以 H₂ 受体阻断剂(H₂RA)替代 PPI(如: 西米替丁 400 mg、雷尼替丁 150 mg、法莫替丁 20 mg), 或选用其他更经济但疗效相当的抗生素如庆大霉素缓释片(胃内滞留型, 瑞贝克)。

2 二线方案 / 补救疗法

2.1 PPI(标准剂量)+B(标准剂量)+M(0.4 g 3/d)+T(0.75-1.0 g)2次/d × 7-14 d.

2.2 PPI(标准剂量)+B(标准剂量)+F(0.1 g)+T(0.75-1.0 g)2次/d × 7-14 d.

治疗药物及缩写: PPI: 质子泵抑制剂 proton pump inhibitor; RBC: 雷尼替丁枸橼酸铋 ranitidine bismuth citrate; B: 铋剂 bismuth; H₂RA: H₂ 受体阻断剂 H₂ receptor antagonist; A: 阿莫西林 amoxicillin; C: 克拉霉素 clarithromycin; M: 甲硝唑 metronidazole; F: 呋喃唑酮 furazolidone; T: 四环素 tetracycline.

胃肠疾病中医证候评分表

危北海, 陈治水, 张万岱

中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会

危北海, 陈治水, 张万岱. 胃肠疾病中医证候评分表. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2701-2703
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2701.asp>

表 1 胃肠疾病中医证候评分表

证候	无 (0 分)	轻(3 分)	中(5 分)	重(7 分)	第一次	第二次	第三次
1 胃脘痞满		每天偶有胃脘痞满, 多在进食后, 每次持续<1 h.	经常有胃脘痞满, 或餐后经常发生, 每次持续 1-3 h.	胃脘痞满程度重, 每次>3 h, 服药后才能缓解.			
2 胃脘疼痛		每天偶有胃脘疼痛(隐痛、胀痛、或刺痛), 1 h 内可自行缓解或进食后缓解, 遇凉则发, 得温则解.	经常发生胃脘疼痛(隐痛、胀痛或刺痛), 程度能忍受, 持续 1-3 h 可缓解.	胃脘疼痛较重(钝痛、刺痛或胀痛), 程度多不能忍受, 每次持续>3 h, 需服药后才能缓解.			
3 胸胁疼痛(胀满、刺痛或隐痛)		每天偶有胸胁胀满或疼痛, 1 h 内可自行缓解.	每天经常胸胁胀满或疼痛, 持续 1-3 h 才能缓解.	每天明显感胸胁胀满或疼痛, 每次持续>3 h, 服药后才能缓解.			
4 少腹胀痛		每天偶有少腹胀满或疼痛, 1 h 内可自行缓解.	每天经常少腹胀满或疼痛, 程度可忍受, 持续 1-3 h 才能缓解.	每天明显感少腹胀满或疼痛, 每次持续>3 h, 程度多不能忍受, 需服药后才能缓解.			
5 纳差		每天进食乏味, 但基本保持原食量.	无食欲, 食量较以前减少 1/3 左右.	厌恶进食, 食量较以前减少 1/2 以上.			
6 食后腹胀		每天食后腹胀轻微, 1 h 内可缓解, 不影响生活.	经常食后腹胀, 持续 1-3 h, 部分影响生活.	明显食后腹胀, 持续>3 h 不缓解, 服药后才能缓解.			
7 早饱		偶有早饱, 不影响食欲和食量.	经常早饱, 稍影响食欲和食量.	持续早饱, 明显影响食量.			
8 多食易饥		偶有多食易饥, 每日食量增加 1/3.	经常多食易饥, 每日食量增加 2/3.	明显多食易饥, 每日食量倍增.			
9 烧心或灼热感		每天偶有烧心感或灼热感, 每次不超过 1 h.	经常有烧心或灼热感, 1-2 h 可缓解.	明显有烧心或灼热感, 持续>2 h, 需服药后才能缓解.			
10 呃逆		偶有呃逆, 每日<4 次.	经常呃逆, 每日 4-10 次.	频繁呃逆, 每日>10 次.			
11 泛酸		偶有泛酸, 每日<4 次.	经常泛酸, 每日 4-10 次.	频繁泛酸, 每日>10 次.			

12 恶心呕吐		偶有恶心,无物吐出,每天 ≤ 2 次.	经常恶心,每天3-4次,时吐涎沫或食物残渣.	明显恶心,每次多伴呕吐,吐出食物残渣,每天 > 4 次.			
13 嗝气		偶有嗝气,每日 ≤ 4 次.	经常嗝气,每日4-10次.	频繁嗝气,每日 > 10 次.			
14 反胃(翻胃)		偶有反胃,或为苦味,或为酸味,每天 ≤ 4 次.	经常反胃,每天4-10次.	明显反胃,每天 > 10 次.			
15 口苦或粘		每天偶有口苦或粘,不影响进食.	经常口苦或粘,稍影响进食.	持续感到口苦或粘,明显影响进食.			
16 喜冷饮		偶有喜冷饮,每日饮水 ≤ 3 次.	经常喜冷饮,每日饮水4-10次.	持续喜冷饮,每日饮水 > 10 次.			
17 口干舌燥		每天偶有口干舌燥,欲饮,饮水量稍增.	经常口干舌燥欲饮,饮水量增加.	持续口干舌燥,饮水量显增.			
18 口渴不欲饮		每日偶有口渴但不欲饮.	每日经常口渴但不欲饮.	每日持续口渴但不欲饮.			
19 口吐清涎		偶有口吐清涎,每日 ≤ 4 次.	经常口吐清涎,每日4-10次.	持续口吐清涎,每日 > 10 次.			
20 口臭		自觉有口臭.	旁人可闻及口臭.	明显口臭,令人难近.			
21 咽部梗阻感		偶有咽部梗阻感,不影响进食,症状可自行缓解.	经常有咽部梗阻感,轻微影响进食,服药后才能缓解.	持续咽部梗阻感,影响进食,短期服药难以缓解.			
22 全身及四肢困重		每天偶有四肢困重,1 h内可自行缓解.	每天经常感到四肢困重,轻度影响工作,2-3 h才能缓解.	每天持续感到四肢困重,明显影响工作,休息后也难以缓解.			
23 大便稀溏		大便稀软或稍溏,每天 ≤ 3 次.	便溏,每天4-5次.	粘液便,每天 > 6 次.			
24 大便干结		大便干结,难解,不费时,1次/3d.	大便干结难解,稍微费时,1次/4-6 d.	大便干结难解,费时,1次/ > 7 d.			
25 里急后重		每日偶有里急后重,不影响情绪和生活.	每日经常有里急后重,轻度影响情绪和生活.	每日持续有里急后重,严重影响情绪和生活.			
26 便血		偶见	时见,量少	常见,量多			
27 四肢无力		偶有四肢倦怠,可坚持一般体力劳动.	四肢疲软,不耐体力活动,勉强维持一般活动.	四肢极无力,不耐日常一般活动.			
28 四肢不温		偶有四肢不温,能够自控	经常四肢不温,有时难以自控	频繁四肢不温,经常难以自控			
29 畏寒怕冷		轻微畏寒,怕进凉食,喜暖,不需加衣被.	明显畏寒,喜按喜暖,进凉食则易患病,较常人稍多加衣被.	显著畏寒怕冷,喜按喜暖,每进凉食即患病,明显较常人多加衣被.			
30 精神疲乏		每天精神不振,不喜多言,但能坚持工作.	精神疲惫,困倦少言,工作能力下降.	精神极度疲乏,欲倦卧不言,工作能力明显下降.			
31 烦躁易急		偶有烦躁易急.	经常烦躁易急.	严重烦躁易急.			
32 失眠多梦		偶有失眠或多梦,不易入睡或易醒,睡眠5-6 h/晚.	经常失眠或多梦,不易入睡或易醒,睡眠4-5 h/晚.	持续失眠或多梦,不易入睡或易醒,睡眠 < 4 h/晚.			

舌象	第一次	
	第二次	
	第三次	
脉象	第一次	
	第二次	
	第三次	

中医脉象的变化难以作为一个疗效评定指标，只宜作为一个辨证分型的评定指标。

中医舌象的变化可以作为一个疗效评定指标，但不宜区别过细，最好从总体改变上去掌握，例如由“薄苔”变“厚苔”，由“苔白”变“苔黄”，由“苔白或黄”变“苔白厚腻或黄厚腻”，由“有苔”变“光滑无苔”等。舌质由“无齿痕”变“有齿痕”，由“红”变“光红”、“深红”、“暗红”或“青紫”，可以做为增加1级或减少1级的指标。

2 疗效评定

2.1 临床证候疗效

治疗前证候积分总数

治疗后证候积分总数

治疗前后积分差

疗效评分 =

治疗前证候积分总数 - 治疗后证候积分总数

治疗前证候积分总数

×100%

- 临床痊愈: 证候基本消失，减少达到 95% 至 100%.
- 显效: 证候明显减少，达到 75% 以上.
- 有效: 证候减少，达到 55% 以上.
- 无效: 证候无减少或稍有减少，仅在 50% 以下.

肠易激综合征中西医结合诊治方案

陈治水, 张万岱, 危北海

中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会

陈治水, 张万岱, 危北海. 肠易激综合征中西医结合诊治方案. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2704-2706

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2704.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrom, IBS)是一种以长期或反复发作的腹痛、腹胀, 伴排便习惯和大便性状异常而目前尚缺乏形态学、细菌学和生化学指标异常的肠功能障碍性综合征。

1 临床表现

- 1.1 腹痛或腹部不适感 疼痛性质多样、程度各异, 多见于左下腹部, 可伴腹胀, 进餐后出现, 排便后缓解。
- 1.2 排便异常 排便次数>3次/d或<3次/wk。性状为稀便、水样便或干硬便, 可带黏液, 排便费力或不尽感, 也可表现为秘泻交替。
- 1.3 肠外症状 可有上消化道症状如烧心、早饱、恶心、呕吐等, 也可有其他系统症状如疲乏、背痛、心悸、呼吸不畅感、尿频、尿急、性功能障碍等。
- 1.4 症状特点 起病缓慢, 间歇性发作, 不具特异性, 症状的出现或加重常与精神心理因素或应激状态有关, 白天明显, 夜间睡眠后减轻。

2 临床类型

2.1 西医分类

2.1.1 腹泻为主型

2.1.2 便秘为主型

2.1.3 混合型 腹泻便秘无规则交替发作为主。

2.2 中医证型

2.2.1 肝郁气滞证

2.2.1.1 主要症候 (1)便秘, 欲便不畅, 便下艰难。(2)胸胁或少腹胀满窜痛。(3)烦躁易怒。(4)脉弦。

2.2.1.2 次要症候 (1)肠鸣矢气。(2)暖气呃逆, 食少纳差。(3)后重窘迫。(4)失眠多梦。(5)口苦咽干、或咽部如有物梗阻感。

2.2.1.3 证型确定 具备主证2项加次证2项, 或主证第一项加次证3项。

2.2.2 肝气乘脾证

2.2.2.1 主要症候 (1)腹痛即泻, 泻后痛减(常因恼怒或精神紧张而发作或加重)。(2)少腹拘急。(3)胸胁胀满窜痛。

(4)脉弦或弦细。

2.2.2.2 次要症候 (1)肠鸣矢气。(2)便下黏液。(3)情志抑郁, 善太息。(4)急躁易怒。(5)纳呆腹胀。

2.2.2.3 证型确定 具备主证2项加次证2项, 或主证第1项加次证3项。

2.2.3 脾胃虚弱证

2.2.3.1 主要症候 (1)经常餐后即泻, 大便时溏时泻, 夹有黏液。(2)食少纳差。(3)食后腹胀, 脘闷不舒。(4)舌质淡, 舌体胖有齿痕, 苔白。(5)脉细弱。

2.2.3.2 次要症候 (1)腹部隐痛喜按。(2)腹胀肠鸣。(3)神疲懒言, 肢倦乏力。(4)面色萎黄。

2.2.3.3 证型确定 具备主证2项加次证2项, 或主证第1项加次证3项。

2.2.4 寒热夹杂证

2.2.4.1 主要症候 (1)腹泻便秘交替发作。(2)便下粘冻或夹泡沫。(3)便前腹痛, 解便即缓而停便发作。(4)舌暗红, 苔白腻。(5)脉弦细或弦滑。

2.2.4.2 次要症候 (1)腹胀肠鸣。(2)口苦。(3)肛门下坠。(4)排便不爽。

2.2.4.3 证型确定 主证2项加次证2项, 或主证3项可确诊。

2.2.5 大肠燥热证

2.2.5.1 主要症候 (1)大便秘积, 数日1行。(2)粪如羊矢, 外裹黏液。(3)少腹结块, 按之胀痛。(4)舌质红, 少津苔黄或黄燥苔。(5)脉细数。

2.2.5.2 次要症候 (1)头晕头胀。(2)形体消瘦。(3)口干或口臭。(4)失眠、焦虑。

2.2.5.3 证型确定 主证2项加次证2项。

3 诊断标准

3.1 症状指标 过去1a中至少12wk连续或间断的腹部不适或疼痛, 并符合以下其中两点可诊断为IBS: (1)排便后缓解;(2)发作时伴大便次数改变(>3次/d或<3次/wk); (3)发作时伴大便性状改变。

此外辅助指标有: (1)大便<3次/wk; (2)大便>3次/d; (3)羊粪样或块状便; (4)糊样便或水样便; (5)排便费力; (6)排便紧迫感; (7)排便不尽感; (8)大便中有黏液; (9)腹部胀满、胀气; (10)全身神经官能症状。

腹泻为主型: 符合第(2)(4)(6)项中的1项或多项而不伴(1)(3)(5)项。

便秘为主型: 符合第(1)(3)(5)项中的1项或多项而不伴(2)(4)(6)项。

混合型: 上述两型症状混杂者。

3.2 检查指标(用于排除器质性病变)

3.2.1 一般情况良好, 系统检查仅发现腹部压痛;

3.2.2 血、尿、便常规及培养(至少3次)正常, 便潜血阴性。

3.2.3 肝、胆、胰腺功能及B超正常。

3.2.4 甲状腺功能测定正常。

3.2.5 X线钡餐灌肠检查无阳性发现或结肠有激惹征象;

3.2.6 肠镜检查示部分患者肠运动亢进, 无明显黏膜异常, 组织学检查基本正常。

3.3 注意事项 既应避免轻率的诊断, 又应避免盲目的检查, 一般可按症状指标诊断并给予试验治疗, 但对下列情况应注意排除器质性病变: (1)年龄在45岁以上者; (2)症状在夜间重或影响睡眠者; (3)伴发热、贫血、便血、体重减轻明显、有肠梗阻症状者; (4)随访中有任何症状体征变异者, 均应认真检查以排除器质性疾病, 特别注意排除乳糖酶缺乏症、甲状腺功能亢进症等疾病。

4 疗效判定标准

4.1 治愈 症状全部消失, 肠道功能正常, 舌脉正常, 随诊复查无异常。

4.2 好转 症状好转, 大便次数减少, 粪便性状接近正常或便秘减轻。

4.3 无效 症状无减轻, 大便次数、大便性状及排便过程异常无改善。

5 治疗

5.1 心理治疗 首先告诉患者通过检查分析已排除器质性疾病, 而确诊为IBS, 科学准确说明疾病的性质和预后, 是一种良性的功能性疾病, 经过治疗调理是完全可以治愈的, 纠正患者曲解的认知, 达到正确认知自己的病情, 树立战胜信心。

通过与患者的交流, 分析暴露其与IBS发病有关的心理机制, 阻断心理因素与临床症状之间的恶性循环, 调整患者的情绪和行为, 建立合理规律的生活方式, 以改善患者的临床症状和生活质量。

5.2 饮食治疗 由于个体对进餐所产生的复杂反应存在差异, 患者大脑皮质对食物的色、香、味等都能诱发胃肠道反应, 因此, 应建议患者对饮食种类进行认真评估, 尽量避免能使自己产生胃肠不适的食物。一般应避免过量的脂肪及刺激性食物如咖啡、浓茶、酒精等的摄取, 对某些食物不耐受明显者, 必须禁食该食物。关于饮食中纤维素含量问题, 应根据病情需要和个体反应情况来确定。

5.3 西药治疗

5.3.1 解痉剂

5.3.1.1 钙离子通道阻滞剂 适用于治疗腹泻为主型或痉挛性便秘的IBS患者, 常用的有匹维溴胺, 50 mg, 3次/d, 饭后口服; 还有奥替溴胺, 40 mg/次, 2-3次/d, 口服。

5.3.1.2 多离子通道调节剂 此类药物可直接作用于细胞膜多离子通道, 对平滑肌运动具有双向调节作用, 故适用于腹泻型和便秘型IBS患者, 马来酸曲美布汀(商品名援生力维、诺为等), 100 mg, 3次/d, 口服。

5.3.1.3 抗胆碱能药 选择性毒蕈碱受体拮抗剂, 常用的有颠茄片, 10 mg; 普鲁本辛片, 15-30 mg; 阿托品片, 0.3-0.6 mg, 均3次/d, 口服。毒蕈碱M₁受体拮抗剂哌吡氮平(pirezepine), 50 mg, 2次/d, 口服, M₃受体拮抗剂扎非那新已试用于临床。

5.3.2 促动力剂 适用于腹胀、胀气和慢通过型便秘的IBS患者。常用有西沙比利和莫沙比利, 均5-10 mg, 3次/d, 口服; 最近推荐的新药有普卡比利、替加色罗(Tegaserod, 泽马可), 均能促进结肠运动, 治疗便秘。

5.3.3 通便剂 对便秘主导型者可试用容积性泻剂, 如纤维素、康肠尔等。慎用刺激性泻剂和高渗性泻剂。

5.3.4 止泻剂 可用于腹泻主导型IBS患者。洛哌丁胺, 2 mg, 3-4次/d, 口服; 复方苯乙哌啶, 2.5-5.0 mg, 3-4次/d, 口服。

5.3.5 抗抑郁药 对伴有精神症状或反复发作者, 可试用小剂量抗抑郁药, 以三环类较为常用, 阿米替林, 10-25 mg, 2-4次/d, 口服; 氟西汀(百忧解), 20 mg, 2-4次/d, 口服。

5.3.6 内脏止痛剂 以下各药均有降低内脏敏感性的作用。

5.3.6.1 生长抑素及其类似物如奥曲肽, 100 μg, 皮下注射。

5.3.6.2 5-HT₄受体阻滞剂 恩丹司琼(ondansetron)和格尼司琼(granisetron)。

5.3.6.3 5-HT₃受体阻滞剂 阿洛司琼, 1 mg, 2次/d, 口服。

5.3.6.4 阿片样受体拮抗剂 如非多托索。

5.3.7 胃肠微生态制剂 适用于伴有肠道菌群失调的IBS患者。常用药物有培菲康、普乐拜尔、金双歧、丽珠肠乐、整肠生、肠泰口服液、谷参肠安等。

5.4 中医药治疗

5.4.1 辨证论治

5.4.1.1 肝郁气滞证 治则: 疏肝理气; 方药: 六磨汤加味(沉香^(后下)、广木香^(后下)、槟榔片、乌药、枳实、生大黄^(后下)、郁金、厚朴) 加減: 腹痛明显者加延胡索、白芍; 肝郁化热见口苦咽干者加黄芩、菊花、夏枯草; 大便硬结者加火麻仁、杏仁。

5.4.1.2 肝气乘脾证 治则: 抑肝扶脾; 方药: 痛泻要方加味(炒白术、生白芍、防风、炒陈皮、柴胡、煨木香、炒枳壳、制香附、生甘草) 加減: 腹痛甚者加延胡索、川楝子; 暖气频繁者加沉香、白蔻仁; 泄泻者加党参、乌梅、木瓜; 腹胀明显者加槟榔片、枳实、大腹皮; 烦躁易怒者加丹皮、栀子; 夜寐差者加炒枣仁、夜交藤。

5.4.1.3 脾胃虚弱证 治则: 健脾益气; 方药: 参苓白术散加減(党参、炒白术、茯苓、白芍、山药、炒扁豆、莲子、薏苡仁、砂仁、炒陈皮、木香、甘草) 加減: 久泄不止、中气不足者加升麻、柴胡、黄芪; 脾虚及肾、清

晨腹泻者加补骨脂、肉豆蔻;腹痛喜按、怯寒便溏者加干姜、肉桂;脾虚湿盛者加苍术、厚朴、藿香、泽泻。

5.4.1.4 寒热夹杂证 治则:平调寒热,益气温中;方药:乌梅丸加减(乌梅、黄连、黄柏、川椒、炙附片、炮姜、党参、白术、茯苓、当归、白芍、甘草)加减:少腹冷痛者去黄连,加小茴香、荔枝核;胃脘灼热、口苦者去川椒、炮姜、附子,加栀子、吴茱萸;大便粘腻不爽、里急后重者加槟榔片、厚朴、山楂炭。

5.4.1.5 大肠燥热证 治则:泄热清肠,润肠通便;方药:麻子仁丸加减(生大黄^(后下)、火麻仁、杏仁、白芍、枳实、白蜜^(冲服)、北沙参、麦冬、当归)加减:便秘重者加玄参、生地、生首乌;腹痛明显者加延胡索。

5.4.2 中成药治疗

5.4.2.1 补脾益肠丸 6-9 g, 3次/d, 适于脾肾两虚所致的慢性泄泻。

5.4.2.2 麻仁丸 6-9 g, 2次/d, 适于肠胃燥热,脾约便秘之实证。

5.4.2.3 麻仁润肠丸 6 g, 3次/d, 适用于虚人便秘。

5.4.2.4 四神丸 9 g, 1-2次/d, 适用于脾肾虚寒之久泻、五更泄泻。

5.4.2.5 便秘通 1支, 2次/d, 适用于虚人便秘。

5.4.2.6 肠胃适 4-6粒, 4次/d, 适用于以湿热型腹泻为主者。

5.4.2.7 谷参肠安 2-4粒, 3次/d, 适用于以脾虚腹泻为主者。

5.4.2.8 六味安消或六味能消胶囊 2粒, 2-3次/d, 适用于便秘主导型。

5.4.3 针灸治疗 泄泻取足三里、天枢、三阴交, 实证用泻法, 虚证用补法。脾胃虚弱加脾腧、章门;脾肾阳虚加肾腧、命门、关元, 也可用灸法;脘痞加公孙;肝郁加肝腧、行间。便秘取背腧穴和腹部募穴及下合穴为主, 一般取大肠腧、天枢、支沟、丰隆, 实证宜泻, 虚证宜补, 寒证加灸。热秘加合谷、曲池;气滞加中脘、行间、用泻法;阳虚加灸神阙。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

吴官正电贺裘法祖院士从医65周年暨90寿辰 裘老拿出140万元奖金设立普通外科医学青年基金

健康报报道(通讯员柯育萍 记者周前进) 华中科技大学同济医学院花团簇簇, 喜气洋洋。湖北省人民政府在这里主办座谈会, 庆祝我国著名医学专家、中科院院士、华中科技大学同济医学院外科学教授裘法祖从医65周年暨90寿辰, 并授予裘院士“人民医学家”荣誉称号。

中共中央政治局常委吴官正、全国人大常委会副委员长路甬祥、德国驻华大使史丹泽、卫生部常务副部长高强、卫生部副部长朱庆生、教育部副部长吴启迪等分别发来贺信或题词表示祝贺。吴官正在贺信中称赞裘老“热爱祖国, 敬业奉献, 学识渊博, 医术精湛, 医德高尚, 做的许多工作都是开拓性的, 为我国的医学教育和医疗事业作出了杰出贡献, 不愧‘人民医学家’的称号”。

裘法祖院士1939年毕业于德国慕尼黑大学医学院, 获医学博士学位, 开始了从医生涯。1947年初, 他放弃在德国优越的工作和生活条件, 带着德国籍妻子和儿子回到祖国。为了祖国的医学事业, 他数十年如一日地辛勤耕作, 对我国外科各专业的创建和发展作出了杰出贡献, 培养了大批包括中国科学院院士、工程院院士在内的杰出医学人才。

又讯(记者雷志勇 通讯员蔡敏) 中科院院士、武汉同济医院教授裘法祖在90华诞之际出资140万元, 设立裘法祖普通外科医学青年基金, 以奖励在普通外科领域取得突出成绩的45岁以下(含45岁)的青年人。当天, 武汉同济医院还现场为此项奖金捐赠10万元。

这140万元是裘法祖获得的4项大奖奖金的总和, 分别是“体外培育牛黄”技术获得的奖金100万元、何梁何利奖20万元、中国医学科学院奖和教材建设特殊奖各10万元。(2004-12-08)

消化内镜预防性使用抗生素指南

American Society of Gastrointestinal Endoscopy

编者按 本文是消化内镜在常见临床情况下应用的系列讨论之一,由美国消化内镜学会提供.在撰写这一指南的过程中,除MEDLINE检索到的文章外,还参考一些专家推荐的文章.内镜的合理应用指南是基于目前的一些重要的综述和专家共识.还需要大量的临床对照研究加以确定和必要的修订.临床上遇到情况和指南有所差异时应适当调整.

何小平, 江学良, 李兆申. 消化内镜预防性使用抗生素指南. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2707-2712

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2707.asp>

1 消化内镜检查和感染并发症的风险

预防性应用抗生素的目的是减少发生严重的感染并发症.然而可能永远都不会有这方面的随机、双盲、安慰剂对照的临床研究.能从文献中得到的是已报道的与日常内镜操作有关的感染并发症的数量和菌血症的发生率.本文更新了 ASGE1995 年公布的该方面的指南^[1].

尽管每年有大量的内镜镜检查,但操作后并发细菌性心内膜炎的报道非常少^[2-16].15例并发心内膜炎的患者中有4例与引起菌血症的高风险操作有关,如食管扩张^[4, 8]、食管硬化剂注射治疗^[11, 14], 剩余11例发生在胃镜^[2-3, 9, 13, 15-16]、乙状结肠镜^[5-7, 12]和结肠镜^[10]检查.其他与食管硬化疗法和扩张治疗有关的罕见感染并发症包括细菌性腹膜炎、中枢神经系统感染和肾周脓肿^[17].

高风险操作是指菌血症发生率高的操作^[1].尽管菌血症有可能发生而且被认为是感染性心内膜炎潜在的危险因素,临床上严重感染罕见.食管狭窄扩张治疗和曲张静脉硬化治疗的菌血症发生率最高^[18].原先估计食管扩张和硬化治疗的菌血症发生率分别是45%和31%,是分别综合了四项研究的59例^[19-22]和61例^[23-26]病例的结果.血培养分离出的病原菌主要是口腔共生菌,如草绿色链球菌.然而一项针对探条扩张术的研究表明菌血症似乎源于扩张器上的病原菌而非口腔共生菌^[9].因为各种研究的方法不同,菌血症真实的发生率可能被高估了.

最近有3项前瞻性研究可能更准确评估了食管探条扩张术后菌血症的发生率,即12-22%^[27-29].在第1项研究中,103例无心瓣膜病的患者在食管狭窄扩张前后做了血培养,对照组为50例接受内镜检查但未扩张的患者,菌血症的发生率分别是21%和2%.24例血培养阳性的标本中19例分离出草绿色链球菌,其中又有2例(10%)菌血症持续近30 min^[27].没有感染并发症的发

生.第2项研究包括86例患者共完成了100次扩张,22%术后血培养阳性,其中恶性狭窄菌血症的发生率高于良性狭窄,多次扩张高于单次扩张.血培养得到的病原菌并非来源于扩张器,亦无感染并发症的发生^[28].第3项研究目的是调查口服抗生素洗液的疗效.59例良性食管狭窄扩张后菌血症总的发生率是12%.分离到的细菌都是口腔共生菌.无感染并发症发生^[29].

食管曲张静脉套扎术(EVL)因为疗效好、并发症少通常可替代食管硬化治疗^[30].6项关于EVL的研究报道该操作菌血症的发生率为1-25%,平均8.8%^[31-36].对通常被认为是低风险的内窥镜检查也作了菌血症发生率的评估.胃镜(取或未取活检)菌血症发生率为0-8%,平均4.4%^[37-45],通常持续时间短(不到30 min),不会发生任何感染并发症.两项研究报道可曲式乙状结肠镜菌血症发生率很低,分别为0和1%^[46-47].结肠镜相关的菌血症发生率是0-25%,平均为4.4%^[17].

迄今无研究证实预防性应用抗生素能有效减少内镜操作过程中感染并发症的发生^[29, 48].另外,接受内镜操作的患者预防性应用抗生素也并不总能成功地防止发生感染性心内膜炎^[49].一项病例对照研究还提示预防性应用抗生素可能并不影响操作后心内膜炎的发生率^[50].其他研究则表明现有预防方案的依从性差^[51-53].

预防性应用抗生素以防止心内膜炎的发生应用于有感染高风险的患者(表1).不主张在消化内镜操作过程中无选择地应用抗生素,因为其增加了不必要的费用和潜在的不良反应.

2 消化内镜预防性应用抗生素的共识

2.1 预防感染性心内膜炎

2.1.1 发生感染性心内膜炎高风险的心脏病变^[54] (1)心脏瓣膜修补,包括生物瓣膜和同种移植瓣膜;(2)既往有细菌性心内膜炎病史;(3)手术重建肺体分流;(4)复杂的紫绀型先天性心脏疾病(如单心室、大动脉错位、Fallot 四联征).

2.1.2 与普通人群相比,不会增加感染性心内膜炎风险的心脏病变^[54] (1)冠状动脉搭桥术;(2)安装有心脏起搏器或植入式除颤器;(3)二尖瓣脱垂或既往有风湿热病史但无瓣膜功能不全或反流;(4)单纯原发孔房间隔缺损;(5)房间隔缺损、室间隔缺损、动脉导管未闭;(6)生理性、功能性或无病理意义的心脏杂音;(7)有川崎病病史但不伴有瓣膜功能不全.

表1 内镜操作预防性使用抗生素

患者状况	操作	预防性应用抗生素
高风险:	狭窄扩张	
瓣膜修补	曲张静脉硬化治疗	主张
心内膜炎病史	对阻塞的胆管行 ERCP	
肺体分流	其他内镜操作包括食管胃	
人造血管移植(<1 a)	十二指肠镜和结肠镜(无论	
复杂的紫绀型先天性心脏病	是否活检/息肉切除)、曲张静脉套扎	可选择
中度风险:	狭窄扩张	
多数其他的先天性异常	曲张静脉硬化治疗	可选择
获得性瓣膜功能不全(如风湿性心脏病)	对阻塞的胆管行 ERCP	
肥厚性心肌病	其他内镜操作包括食管胃	
二尖瓣脱垂伴反流或叶瓣增厚	十二指肠镜和结肠镜(无论	不主张
	是否活检/息肉切除)、曲张静脉套扎	
低风险:		
其他心脏情况(冠状动脉搭桥术, 已修复		
的间隔缺损或导管未闭、不伴反流的二尖		
瓣脱垂、单纯原发孔房间隔缺损、生理	所有内镜操作	不主张
性/功能性/无病理意义的杂音、无		
瓣膜功能不全的风湿热, 安装了起搏器、除颤器)		
胆管阻塞	ERCP	主张
胰腺囊性病灶	ERCP、EUS-FNA	主张
急性消化道出血的肝硬化	所有内镜操作	主张
腹水、免疫功能受损患者	食管狭窄扩张	
	曲张静脉硬化治疗	无建议
	其他内镜操作包括食管胃十二指肠镜	
	和结肠镜(无论是否活检/息肉切除)、	不主张
	曲张静脉套扎	
所有患者	内镜下经皮置胃管	推荐(胃肠外给予头孢菌素
		或其他等效抗生素)
人造关节	所有内镜操作	不主张
心内膜炎预防方案(1 h前口服, 30 min前静推或肌注) 阿莫西林口服或氨苄青霉素静推: 成人 2.0 g 儿童 50 mg/kg		
青霉素过敏: 氯林可霉素(成人 600 mg 儿童 20mg/kg), 或先锋霉素 IV 或头孢羟氨苄(成人 2.0 g 儿童 50 mg/kg),		
或阿奇霉素或克拉霉素(成人 500 mg 儿童 15 mg/kg)或先锋霉素 V(成人 1.0 g 儿童 25 mg/kg 静推/肌注),		
或万古霉素(成人 1.0 g 儿童 10–20 mg/kg 静推)		

2.1.3 与普通人群相比, 增加感染性心内膜炎的风险但程度低于高风险的心脏病变^[54–56] (1)其他多数先天性心脏畸形(除上述列举之外); (2)获得性瓣膜功能不全(如风湿性心脏病); (3)肥厚性心肌病; (4)二尖瓣脱垂伴瓣膜反流和/或叶瓣增厚。

2.1.4 建议 (1)对于多数内镜操作, 如上消化道内镜、乙状结肠镜、结肠镜, 无论是否做黏膜活检、息肉切除和/或非曲张静脉止血: 与普通人群相比有中度风险以及无风险的患者不主张预防性应用抗生素, 例如对于二尖瓣脱垂患者无论是否伴有反流在接受上述操作时无须预防性应用抗生素; 有不充分的依据推荐对于

高风险患者应常规预防性应用抗生素。内镜医生应根据具体病例分析决定。(2)增加一过性菌血症机会的内窥镜检查操作包括食管狭窄的扩张、曲张静脉硬化治疗以及对明确或可能有阻塞的胆管行逆行胆管造影: 高风险患者主张预防性应用抗生素; 无风险的心脏病患者不主张应用, 然而所有明确有或怀疑有胆管阻塞的患者接受 ERCP 操作前, 主张预防性应用抗生素; 有不充分的依据推荐中等风险的心脏病患者常规预防性应用抗生素。内镜医师应根据具体情况分析决定。

2.1.5 方案^[54] (1)标准常规预防方案: 操作前 1 h 口服阿莫西林 2.0 g(成人)或 50 mg/kg(儿童)。不能口服者的替代

方案为操作前30 min内氨苄青霉素2.0 g静推/肌注(成人)或50 mg/kg静推/肌注(儿童). (2)青霉素过敏者: 操作前1 h口服氯林可霉素600 mg(成人)或20 mg/Kg(儿童). 替代方案: 操作前1 h口服先锋霉素IV或头孢羟氨苄2.0 g(成人)或50 mg/kg(儿童); 阿奇霉素或克拉霉素操作前1 h口服500 mg(成人)或15 mg/kg(儿童). (3)青霉素过敏但无法口服的患者: 操作前30 min内氯林可霉素600 mg静推(成人)或20 mg/kg静推(儿童). 替代方案: 操作前30 min内先锋霉素V 1.0 g静推/肌注(成人)或25 mg/kg静推/肌注(儿童). 万古霉素1.0 g静推(成人)或10–20 mg/kg(儿童).

2.2 人造血管移植术后患者 人造血管的移植材料感染有着可怕的发病率和死亡率, 但移植感染风险随时间的推移会下降. 肾下动脉聚脂纤维移植术后的狗接种金黄色葡萄球菌, 术后1 mo内的狗全部获得感染, 术后1 a狗感染数目明显减少. 单次初始剂量的抗生素显著降低了感染率. 当全部的假内膜被覆盖后就不会发生感染, 因此有理由推测假内膜覆盖在1 a内完成. 建议: 人造血管移植术后1 a内的患者接受食管狭窄扩张、曲张静脉硬化治疗或在明确有或怀疑有胆管阻塞情况下行逆行胆管造影时, 应预防性使用抗生素. 对于其他内镜操作, 常规应用抗生素的依据尚不充分. 内镜医生应根据具体情况分析决定.

2.3 安装了人造关节或整形假体的患者 内镜操作后医源性人造关节感染极其罕见. 与内镜操作(Nd: YAG激光治疗已失去手术机会的食管癌)相关的感染并发症(化脓性膝关节炎)仅见1例报道^[57]. 在感染性疾病培训基金的项目主管间进行一次调查, 询问他们关于带有整形假体的患者接受消化内镜操作时是否需要预防性应用抗生素的意见. 然而针对假体安装6 mo内患者接受结肠息肉电切术时是否应使用抗生素意见都有分歧^[58]. 建议: 有尚不充分的依据主张带有人造关节或整形假体患者接受消化道内镜操作时应预防性使用抗生素.

2.4 伴胆管阻塞、胰腺假性囊肿或需行细针抽吸术(FNA)的胰腺囊性病灶患者 胆管炎和败血症是已知的逆行胰胆管造影(ERCP)的并发症, 发生率接近3.0%. 胆管阻塞和不恰当的引流会增加临床严重感染的风险^[59–60]. 这类患者身上有许多病原菌都能导致感染. 胆汁培养液的抗生素测试证实多数病原菌对氟喹诺酮类药物敏感^[70]. 一项近期的荟萃分析表明这类患者预防性应用抗生素有减少菌血症发生的趋势^[71]. 然而败血症的发生率无显著差异. 最近另一具有决定性意义的分析表明预防性使用抗生素能降低胆管炎的发生率并减少患者费用^[72]. 与上述发现一致, 尽管似乎对胆管引流不畅(如胆石症、恶性肿瘤等)的患者预防性应用抗生素是有意义的^[72–81], 许多临床随机对照试验的结果相互矛盾.

2.4.1 假性囊肿 逆行胰管造影、可能还有超声内镜引导的FNA都会造成假性囊肿的感染^[62, 66, 68]. 明确的治疗措施是减压和引流. 尚没有随机对照研究比较预防性应

用抗生素和安慰剂的疗效. 然而考虑到感染的风险, 预防性应用抗生素显然是慎重的.

2.4.2 EUS引导的实性或囊性病灶的FNA 一项评价EUS引导下的占位性病灶FNA疗效的研究中没发现发生临床有意义的菌血症^[82]. 随机对照研究尚未明确EUS引导下胰腺囊肿FNA中预防性应用抗生素的意义. 一项分组分析表明胰腺囊肿FNA发生感染并发症的风险是14%^[83]. 建议: 所有明确有或怀疑有胆管阻塞的患者、胰腺假性囊肿的患者在进行ERCP检查前应预防性应用抗生素, 并同时阻塞的胆管或囊肿行恰当的引流. 内镜下胰腺假性囊肿的透壁引流同样可能会导致腔内感染. 另外, EUS引导下的胰腺囊性病灶的FNA也有这种可能性. 尽管尚未被随机对照研究所证实, 仍主张在引流假性囊肿或类似的胰腺病灶前预防性使用抗生素. 推荐使用抗菌谱覆盖胆道细菌菌落如肠革兰氏阴性菌, 肠球菌和假单孢杆菌的抗生素. 实性占位性病灶行FNA不需要预防性应用抗生素.

2.5 内镜下经皮放置胃管 多项前瞻性随机对照研究表明在经皮胃切开置管前30 min预防性使用抗生素能显著减少胃周伤口的感染^[84–88]. 然而也有一些随机研究得到相反的结果^[89–90]. 最近对7项研究(其中3项未采用盲法)的荟萃分析证实接受抗生素预防的患者其胃周伤口感染率显著低于未使用者(分别是6.4%、24%)^[91].

建议: 所有接受内镜下经皮置胃管术的患者均应预防性使用抗生素以预防软组织感染. 应在操作前30 min胃肠外给予先锋霉素V或抗菌谱相同的其他抗生素. 如患者已使用了等效抗生素, 那么不需要另外预防性应用抗生素.

2.6 肝硬化、腹水及免疫功能受损患者 除个案报道和回顾性研究之外, 几乎没有资料可用来明确肝硬化、腹水和免疫功能受损患者常规内镜操作前是否需预防性应用抗生素.

2.6.1 注射硬化剂 硬化治疗菌血症的发生率接近50%^[23, 25, 32, 47, 92–96]. 临床试验中接近5%患者有明显发热和/或细菌性腹膜炎^[92–94, 96–97]. 已报道的其他并发症还包括中枢神经系统的感染和肺部浸润. 一项研究报道胃曲张静脉的硬化治疗菌血症发生率接近32%, 其中大约1/3患者有发热, 50%的患者接受了抗生素治疗^[100]. 一些随机对照研究支持硬化治疗前使用抗生素^[48, 101–103], 然而研究者未采用安慰剂对照的盲法研究. 有一随机试验表明预防性应用头孢氨噻患者硬化治疗后腹膜炎的发生率减低^[48].

2.6.2 内镜下曲张静脉套扎治疗 据报道套扎后菌血症的发生率近25%, 腹膜炎的发生率不到5%^[31, 33, 35–36]. 尚无这方面随机双盲安慰剂对照的有关预防性应用抗生素的临床研究.

2.6.3 消化道出血 肝硬化因消化道出血而收治入院者感染(尤其是细菌性腹膜炎)的风险大大增加^[31, 48, 94]. 目前消化道出血被认为是肝硬化患者发生感染的独立的危

险因子^[97]. 抗生素的使用能减少感染并发症并降低死亡率^[48, 101-103].

2.6.4 狭窄扩张 在免疫功能正常患者中的情况前面已经讨论过了, 免疫功能受损患者食管扩张导致临床有意义菌血症的比率有待明确.

建议: 肝硬化及其他免疫功能受损患者易因一过性菌血症而发生感染, 接受侵入性操作时风险更高^[104-113]. 内镜医师应根据具体病例分析决定在进行高风险操作如食管硬化治疗和狭窄扩张时是否使用抗生素. 但所有消化道出血的肝硬化患者均应预防性使用抗生素^[31, 48, 94, 100-102].

对于其他内镜操作包括预防性曲张静脉套扎术, 不主张常规使用抗生素. 然而亦应根据具体情况来分析决定. 肝硬化腹水患者有发生感染的较高的潜在风险. 移植患者大量使用非甾体药物也增加了感染易感性, 抗生素的选择应根据特定的情况分析决定.

总之, 高风险心脏疾病患者接受一过性菌血症发生率高的内窥镜操作时主张预防性应用抗生素以防止发生感染性心内膜炎(专家意见). 人造血管移植术后1a内的患者在接受高风险内镜操作时应预防性使用抗生素(专家意见). 安装了人造关节或整形假体的患者接受任何内镜操作时预防应用抗生素的意义还不明确或未达成共识(专家意见). 所有明确或怀疑有胆管阻塞患者以及胰腺假性囊肿患者在接受ERCP检查前应使用抗生素并辅以恰当的对阻塞胆管(前瞻性对照临床研究)或囊肿的引流(专家意见). EUS引导下胰腺囊性病灶细针抽吸术前主张预防性应用抗生素, 对胰腺实性病灶则不需要(专家意见). 所有接受内镜下经皮置胃管术的患者应预防性使用抗生素以限制软组织感染的风险(前瞻性对照临床研究). 所有消化道出血的肝硬化患者应预防性使用抗生素以降低感染并发症及死亡率(前瞻性对照临床研究).

3 参考文献

- ASGE. Antibiotic prophylaxis for gastrointestinal endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1995;42:630-635
- Rumfeld W, Wallace G, Scott BB. Bacterial endocarditis after endoscopy. *Lancet* 1980;2:1083
- Shorvon PJ, Eykyn SJ, Cotton PB. Gastrointestinal instrumentation, bacteremia, and endocarditis. *Gut* 1983;24:1078-1093
- Yin TP, Dellipiani AW. Bacterial endocarditis after Hurst bougienage in a patient with a benign oesophageal stricture. *Endoscopy* 1983;15:27-28
- Rodriguez W, Levine JS. Enterococcal endocarditis following flexible sigmoidoscopy. *West J Med* 1984;140:951-953
- Murray JL. Enterococcal endocarditis after sigmoidoscopy. *West J Med* 1984;141:689-690
- Rigilano J, Mahapatra R, Barnhill J, Gutierrez J. Enterococcal endocarditis following sigmoidoscopy and mitral valve prolapse. *Arch Intern Med* 1984;144:850-851
- Niv Y, Bat L, Motro M. Bacterial endocarditis after Hurst bougienage in a patient with benign esophageal stricture and mitral valve prolapse. *Gastrointest Endosc* 1985;31:265-267
- Logan RF, Hastings JG. Bacterial endocarditis: a complication of gastroscopy. *Br Med J* 1988;296:1107
- Watanakunakorn C. Streptococcus bovis endocarditis associated with villous adenoma following colonoscopy. *Am Heart J* 1988;116:1115-1116
- Baskin G. Prosthetic endocarditis after endoscopic variceal sclerotherapy: A failure of antibiotic prophylaxis. *Am J Gastroenterol* 1989;84:311-312
- Norfleet RG. Infectious endocarditis after fiberoptic sigmoidoscopy. *J Clin Gastroenterol* 1991;13:448-451
- Pritchard TM, Foust RT, Cantly JR, Lemman RB. Prosthetic valve endocarditis due to *Cardiobacterium hominis* occurring after upper gastrointestinal endoscopy. *Am J Med* 1991;90:516-518
- Wong A, Rosenstein AH, Rutherford RE, James SP. Bacterial endocarditis following endoscopic variceal sclerotherapy. *J Clin Gastroenterol* 1997;24:90-91
- Breuer GS, Yinnon AM, Halevy J. Infective endocarditis associated with upper endoscopy. *J Infect* 1998;36:342-344
- Montalto M, La Regina M, Gemelli P, Manna R, Gasbarrini G. Mitral valve endocarditis caused by *Streptococcus oralis* occurring after upper gastrointestinal endoscopy. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2149-2150
- Nelson DB. Infectious disease complications of gastrointestinal endoscopy. Part I: endogenous infections. *Gastrointest Endosc* 2003;57:546-556
- Botoman VA, Surawicz CM. Bacteremia with gastrointestinal endoscopic procedures. *Gastrointest Endosc* 1986;32:342-346
- Raines DR, Branche WC, Anderson DL, Boyce HW Jr. The occurrence of bacteremia after esophageal dilation. *Gastrointest Endosc* 1975;22:86-87
- Stephenson PM, Dorrington L, Harris OD, Rao A. Bacteraemia following oesophageal dilation and oesophago-gastroscopy. *Aust NZ J Med* 1977;7:32-35
- Welsh JD, Griffiths WJ, McKee J, Wilkinson D, Flournoy DJ, Mohr JA. Bacteremia associated with esophageal dilation. *J Clin Gastroenterol* 1983;5:109-112
- Yin TP, Ellis R, Dellipiani AW. The incidence of bacteremia after outpatient Hurst bougienage in the management of benign esophageal stricture. *Endoscopy* 1983;15:289-290
- Camara DS, Gruber M, Barde CJ, Montes M, Caruana JA, Chung RS. Transient bacteremia following endoscopic injection sclerotherapy of esophageal varices. *Arch Intern Med* 1983;143:1350-1352
- Cohen LB, Korsten MA, Scherl EJ, Velez ME, Fisse RD, Arons EJ. Bacteremia after endoscopic injection sclerosis. *Gastrointest Endosc* 1983;29:198-200
- Brayko CM, Kozarek RA, Sanowski RA, Testa AW. Bacteremia during esophageal variceal sclerotherapy: its cause and prevention. *Gastrointest Endosc* 1985;31:10-12
- Snady H, Korsten MA, Wayne JD. The relationship of bacteremia to the length of injection needle in endoscopic variceal sclerotherapy. *Gastrointest Endosc* 1985;31:243-246
- Zuccaro G, Richter JE, Rice TW, Achkar E, Easley K, Lewis J. Viridans streptococcal bacteremia after esophageal stricture dilation. *Gastrointest Endosc* 1998;48:568-573
- Nelson DB, Sanderson SJ, Azar MM. Bacteremia with esophageal dilation. *Gastrointest Endosc* 1998;48:563-567
- Hirota WK, Wortmann GW, Maydonovitch CL, Chang AS, Midkiff RB, Wong RK, Moses FM. The effect of oral decontamination with clindamycin palmitate on the incidence of bacteremia after esophageal dilation. A prospective trial. *Gastrointest Endosc* 1999;50:475-479
- Laine L, Cook D. Endoscopic ligation compared with sclerotherapy for treatment of esophageal variceal bleeding: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995;123:280-287
- Lo GH, Lai K, Shen M, Chang C. A comparison of the incidence of transient bacteremia and infectious sequelae after sclerotherapy and rubber band ligation of bleeding esophageal varices. *Gastrointest Endosc* 1994;40:675-679
- Lo G, Lai K, Cheng J, Hwu J, Chang C, Chen S. A prospective, randomized trial of sclerotherapy versus ligation in the management of bleeding esophageal varices. *Hepatology* 1995;22:466-471
- Tseng C, Green RM, Burke SK, Connors PJ, Carr-Locke DL. Bacteremia after endoscopic band ligation of esophageal varices. *Gastrointest Endosc* 1992;38:336-337
- Berner JS, Gaing AA, Sharma R, Almenoff PL, Muhlfielder T, Korsten MA. Sequelae after esophageal variceal ligation and sclerotherapy: a prospective randomized study. *Am J Gastroenterol* 1994;89:852-858

- 35 da Silveira Rohr MR, Siqueira ES, Brant CQ, Morais M, Libera ED, Castro RR. Prospective study of bacteremia rate after elastic band ligation and sclerotherapy of esophageal varices in patients with hepatosplenic schistosomiasis. *Gastrointest Endosc* 1997;46:321-323
- 36 Lin OS, Wu SS, Chen YY, Soon MS. Bacterial peritonitis after elective endoscopic variceal ligation: a prospective study. *Am J Gastroenterol* 2000;95:214-217
- 37 Linnemann C, Weisman E, Wenger J. Blood cultures following endoscopy of the esophagus and stomach. *South Med J* 1971;64:1055-1062
- 38 Shull HJ, Greene BM, Allen SD, Dunn GD, Schenker S. Bacteremia with upper gastrointestinal endoscopy. *Ann Intern Med* 1975;83:212-214
- 39 Liebermann TR. Bacteremia and fiberoptic endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1976;23:36-37
- 40 Mellow MH, Lewis RJ. Endoscopy-related bacteremia. *Arch Intern Med* 1976;136:667-669
- 41 Baltch AL, Buhac I, Agrawal A, O'Connor P, Bram M, Malatino E. Bacteremia after upper gastrointestinal endoscopy. *Arch Intern Med* 1977;137:594-597
- 42 Stray N, Midtvedt T, Valnes K, Rosseland A, Pytte R, Hoivik B. Endoscopy-related bacteremia. *Scan J Gastroenterol* 1978;13:345-347
- 43 Kirk A, Graham-Brown R, Perinpanayagam RM, Smith RG, Barnardo DE. Bacteremia and upper gastrointestinal fibre-endoscopy. *J Roy Soc Med* 1979;72:409-411
- 44 Norfleet RG, Mitchell PD, Mulholland D, Philo J. Does bacteremia follow upper gastrointestinal endoscopy. *Am J Gastroenterol* 1981;76:420-422
- 45 O'Connor HJ, Hamilton I, Lincoln C, Maxwell S, Axon AT. Bacteremia with upper gastrointestinal endoscopy-a reappraisal. *Endoscopy* 1983;15:21-23
- 46 Goldman GD, Miller SA, Furman DS, Brock D, Ryan JL, McCallum RW. Does bacteremia occur during flexible sigmoidoscopy. *Am J Gastroenterol* 1985;80:621-623
- 47 Llach J, Elizalde JJ, Bordas JM, Gines A, Almela M, Sans M. Prospective assessment of the risk of bacteremia in cirrhotic patients undergoing lower intestinal endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1999;49:214-217
- 48 Selby WS, Norton ID, Pokorny CS, Benn RA. Bacteremia and bacterascites after endoscopic sclerotherapy for bleeding esophageal varices and prevention by intravenous cefotaxime: a randomized trial. *Gastrointest Endosc* 1994;40:680-684
- 49 Durack DT, Kaplan EL, Bisno AL. Apparent failures of endocarditis prophylaxis. *JAMA* 1983;250:2318-2322
- 50 Van der Meer JT, Van Wijk W, Thompson J, Vanderbroucke JP, Valkenburg HA, Michel MF. Efficacy of antibiotic prophylaxis for prevention of native-endocarditis. *Lancet* 1992;339:135-139
- 51 Meyer GW. Prophylaxis of infective endocarditis during gastrointestinal procedures: report of a survey. *Gastrointest Endosc* 1979;25:1-2
- 52 Brooks RG, Notario G, McCabe RE. Hospital survey of antimicrobial prophylaxis to prevent endocarditis in patients with prosthetic heart valves. *Am J Med* 1988;84:617-621
- 53 Sandowsky D, Kunzel C. Recommendations for prevention of bacterial endocarditis: compliance by dental practitioners. *Circulation* 1988;77:1316-1318
- 54 Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P. Prevention of bacterial endocarditis. Recommendation by the american heart association. *Circulation* 1997;96:358-366
- 55 Malone JM, Moore WS, Campagna G, Bean B. Bacteremic infectability of vascular grafts: The influence of pseudointimal integrity and duration of graft function. *Surgery* 1975;78:211-216
- 56 Moore WS, Rosson CT, Hall AD. Effect of prophylactic antibiotics in preventing bacteremic infection of vascular prosthesis. *Surgery* 1971;69:825-828
- 57 Scott NA, Tweedle DE. Pyogenic arthritis of the knee following Nd:YAG laser destruction of an esophageal cancer. *Gastrointest Endosc* 1990;36:545-546
- 58 Meyer GW, Artis AL. Antibiotic prophylaxis for orthopedic prostheses and GI procedures: Report of a survey. *Am J Gastroenterol* 1997;92:989-992
- 59 Zimmon DS, Falkenstein DB, Riccobono C, Aaron B. Complications of endoscopic retrograde cholangiopancreatography: analysis of 300 consecutive cases. *Gastroenterology* 1975;69:303-309
- 60 Bilbao MK, Dotter CT, Lee TG, Katon RM. Complications of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP): a study of 10,000 cases. *Gastroenterology* 1976;70:314-320
- 61 Nuehaus B, Safrany L. Complications of endoscopic sphincterotomy and their treatment. *Endoscopy* 1981;13:197-199
- 62 Leese T, Neoptolemos JP, Carr-Locke DL. Successes, failures, early complications and their management following endoscopic sphincterotomy: results in 394 consecutive patients from a single centre. *Br J Surg* 1985;72:215-219
- 63 Vaira D, D'Anna L, Ainley C, Dowsett J, Williams S, Baillie J. Endoscopic sphincterotomy in 1000 consecutive patients. *Lancet* 1989;2:431-433
- 64 Deviere J, Motte S, Dumonceau JM, Serruys E, Thys JP, Cremer M. Septicemia after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Endoscopy* 1990;22:72-75
- 65 Cotton PB, Lehman G, Vennes J, Geenen JE, Russell RC, Meyers WC, Liguory C, Nickl N. Endoscopic sphincterotomy complications and their management: an attempt at consensus. *Gastrointest Endosc* 1991;37:383-393
- 66 Freeman ML, Nelson DB, Sherman S, Haber GB, Herman ME, Dorsher PJ. Complications of endoscopic biliary sphincterotomy. *N Engl J Med* 1996;335:909-918
- 67 Loperfido S, Angelini G, Benedetti G, Chilovi F, Costan F, De Berardinis F. Major early complications from diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study. *Gastrointest Endosc* 1998;48:1-10
- 68 Masci E, Toti G, Mariani A, Curioni S, Lomazzi A, Dinelli M. Complications of diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:417-423
- 69 Lorenz R, Herrman M, Kassem AM, Lehn N, Neuhaus H, Classen M. Microbiological examinations and in-vitro testing of different antibiotics in therapeutic endoscopy of the biliary system. *Endoscopy* 1998;30:708-712
- 70 Lai EC, Lo CM, Choi TK, Cheng WK, Fan ST, Wong J. Urgent biliary decompression after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Am J Surg* 1989;157:121-125
- 71 Harris A, Chan AC, Torres-Viera C, Hammett R, Carr-Locke D. Meta-analysis of antibiotic prophylaxis in endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). *Endoscopy* 1999;31:718-724
- 72 Thompson BF, Arguedas MR, Wilcox CM. Antibiotic prophylaxis prior to endoscopic retrograde cholangiopancreatography in patients with obstructive jaundice: is it worth the cost? *Alimentary Pharmacol Ther* 2002;16:727-734
- 73 Niederau C, Pohlmann U, Lubke H, Thomas L. Prophylactic antibiotic treatment in therapeutic or complicated diagnostic ERCP: results of a randomized, controlled study. *Gastrointest Endosc* 1994;40:533-537
- 74 Leung JW, Venezuela RR. Cholangiosepsis: endoscopic drainage and antibiotic therapy. *Endoscopy* 1991;23:220-223
- 75 Sauter G, Grabein B, Huber G, Mannes GA, Ruckdeschel G, Sauerbruch T. Antibiotic prophylaxis of infectious complications with endoscopic retrograde cholangiopancreatography. A randomized controlled study. *Endoscopy* 1990;22:164-167
- 76 Byl B, Deviere J, Struelens MJ, Roucloux J, DeConinck A, Thys JP. Antibiotic prophylaxis for infectious complications after therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Inf Dis* 1995;20:1236-1240
- 77 Finkelstein R, Yassin K, Suissa A, Lavy A, Eidelman S. Failure of cefonicid prophylaxis for infectious complications related to endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Clin Infect Dis* 1996;23:378-379
- 78 Van den Hazel SJ, Speelman P, Tygat GNJ, Dankert J, van Leeuwen DJ. Antibiotic prophylaxis with piperacillin does not prevent ERCP-induced cholangitis. *Gastrointest Endosc* 1995;41:332

- 79 Mehal WZ, Culshaw KD, Tillotson GS, Chapman RW. Antibiotic prophylaxis for ERCP: a randomized clinical trial comparing ciprofloxacin and cefuroxime in 200 patients at high risk for cholangitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:841-845
- 80 Brandes JW, Scheffer B, Lorenz-Meyer H, Korst HA, Littmann KP. ERCP: Complications and prophylaxis. A controlled study. *Endoscopy* 1981;13:27-30
- 81 Dutta SK, Cox M, Williams RB, Eisenstat TE, Standiford HC. Prospective evaluation of the risk of bacteremia and the role of antibiotics in ERCP. *J Clin Gastroenterol* 1983;5:325-329
- 82 Barawi M, Gottlieb K, Cunha B, Portis M, Gress F. A prospective evaluation of the incidence of bacteremia associated with EUS-guided fine-needle aspiration. *Gastrointest Endosc* 2001; 53:189-192
- 83 Wiersema MJ, Vilmann P, Giovannini M, Chang K, Wiersema L. Endosonography guided Fine-Needle aspiration biopsy: diagnostic accuracy and complication assessment. *Gastroenterology* 1997;112:1087-1095
- 84 Jain NK, Larson DE, Schroeder KW, Burton DD, Cannon KP, Thompson RL, DiMagno EP. Antibiotic prophylaxis for percutaneous endoscopic gastrostomy. A prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Ann of Intern Med* 1987;107:824-828
- 85 Panigrahi H, Shreeve DR, Tan WC, Prudham R, Kaufman R. Role of antibiotic prophylaxis for wound infection in percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG): result of a prospective double-blind randomized controlled trial. *J Hosp Infection* 2002;50:312-315
- 86 Gossner L, Keymling J, Hahn EG, Ell C. Antibiotic prophylaxis in percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG): a prospective, randomized clinical trial. *Endoscopy* 1999;31:119-124
- 87 Dormann AJ, Wigglinghaus B, Risius H, Kleimann F, Kloppenborg A, Grunewald T. A single dose of ceftriaxone administered 30 minutes before percutaneous endoscopic gastrostomy significantly reduces local and systemic infective complications. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3220-3224
- 88 Preclik G, Grune S, Leser HG, Leberherz J, Heldwein W, Machka K. Prospective, randomized, double-blind trial of prophylaxis with single dose of co-amoxiclav before percutaneous endoscopic gastrostomy. *BMJ* 1999;319:881-884
- 89 Jonas SK, Neimark S, Panwalker AP. Effect of antibiotic prophylaxis in percutaneous endoscopic gastrostomy. *Am J Gastroenterol* 1985;80:438-441
- 90 Sturgis TM, Yancy W, Cole JC, Proctor DD, Minhas BS, Marcuard SP. Antibiotic prophylaxis in percutaneous endoscopic gastrostomy. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2301-2304
- 91 Sharma V, Howden CW. Meta-analysis of randomized, controlled trials of antibiotic prophylaxis before percutaneous endoscopic gastrostomy. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3133-3136
- 92 Schembre D, Bjorkman DJ. Post-sclerotherapy bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 1991;86:481-485
- 93 Gerhartz HH, Sauerbruch T, Weinzierl M, Ruckdeschel G. Nosocomial septicemia in patients undergoing sclerotherapy for variceal hemorrhage. *Endoscopy* 1984;16:129-130
- 94 Bac DJ, de Marie S, Siersema PD, Snobl J, van Buuren HR. Post-sclerotherapy bacterial peritonitis: a complication of sclerotherapy or of variceal bleeding? *Am J Gastroenterol* 1994;89: 859-862
- 95 de la Pena J, Rivero M, Sanchez E, Fabrega E, Crespo J, Pons-Romero F. Variceal ligation compared with endoscopic sclerotherapy for variceal hemorrhage: prospective randomized trial. *Gastrointest Endosc* 1999;49:417-423
- 96 Tam F, Chow H, Prindiville T, Cornish D, Haulk T, Trudeau W, Hoeprich P. Bacterial peritonitis following esophageal injection sclerotherapy for variceal hemorrhage. *Gastrointest Endosc* 1990;36:131-133
- 97 Deschenes M, Villeneuve JP. Risk factors for the development of bacterial infections in hospitalized patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2193-2197
- 98 Umehara M, Onda M, Tajiri T, Toba M, Yoshida H, Yamashita K. Sclerotherapy plus ligation versus ligation for the treatment of esophageal varices: a prospective randomized study. *Gastrointest Endosc* 1999;50:7-12
- 99 al Traif I, Fachartz FS, Al Jumah A, Al Johani M, al-Omar A, al-Bakr F, al-Knawy B, el-Hafi A, Khan MH. Randomized trial of ligation versus combined ligation and sclerotherapy for bleeding esophageal varices. *Gastrointest Endosc* 1999;50: 1-6
- 100 Chen WC, Hou MC, Lin HC, Yu KW, Lee FY, Chang FY, Lee SD. Bacteremia after endoscopic injection of N-butyl-2-cyanoacrylate for gastric variceal bleeding. *Gastrointest Endosc* 2001;54:214-218
- 101 Rimola A, Bory F, Teres J, Perez-Ayuso RM, Arroyo V, Rodes J. Oral, nonabsorbable antibiotics prevent infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1985;5:463-467
- 102 Blaise M, Pateron D, Trinchet JC, Levacher S, Beaugrand M, Pourriat JL. Systemic antibiotic therapy prevents bacterial infection in cirrhotic patients with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1994;20:34-38
- 103 Soriano G, Guarner C, Tomas A, Villanueva C, Torras X, Gonzalez D, Sainz S, Anguera A, Cusso X, Balanzo J. Norfloxacin prevents bacterial infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterology* 1992;103:1267-1272
- 104 Petersen JH, Weesner RE, Giannella RA. Escherichia Coli peritonitis after left-sided colonoscopy in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Gastroenterol* 1987; 82: 171-172
- 105 Lee M, Munoz J. Septicemia occurring after colonoscopic polypectomy in a splenectomized patient taking corticosteroids. *Am J Gastroenterol* 1994;89:2245-2246
- 106 Shemesh O, Bornstein IB, Weissberg N, Braverman DZ, Rudensky B. Listeria septicemia after colonoscopy in an ulcerative colitis patient receiving ACTH. *Am J Gastroenterol* 1990; 85:216
- 107 Thornton JR, Losowsky MS. Septicaemia after colonoscopy in patients with cirrhosis. *Gut* 1991;32:450-451
- 108 Kaw K, Przepiorka D, Sekas G. Infectious complications of endoscopic procedures in bone marrow transplant recipients. *Dig Dis Sci* 1993;38:71-74
- 109 Bianco JA, Pepe MS, Higano C, Applebaum FR, McDonald GB, Singer JW. Prevalence of clinically relevant bacteremia after upper gastrointestinal endoscopy in bone marrow transplant recipients. *Am J Med* 1990;89:134-135
- 110 Jimenez-Saenz M, Gomez-Rodriguez BJ, Carmona I, Rebollo J, Torres Y, Rodriguez-Banos J, Herrerias-Gutierrez JM. Salmonella dublin infection: a rare cause of spontaneous bacterial peritonitis and chronic colitis in alcoholic liver cirrhosis. *European J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:587-589
- 111 Mabee CL, Mabee SW, Kirkpatrick RB, Koletar SL. Cirrhosis: a risk factor for cryptococcal peritonitis. *Am J Gastroenterol* 1995;90:2042-2045
- 112 Shrake PD, Troiano F, Rex DK. Peritonitis following colonoscopy in a cirrhotic with ascites. *Am J Gastroenterol* 1989;84:453-454
- 113 Verger C, Danne O, Vuillemin F. Colonoscopy and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Gastrointest Endosc* 1987; 33:334-335

(何小平 译 江学良 校 李兆申 审, 200433, 上海市长海路 174 号, 长海医院 消化内科)

软式消化内镜消毒指南

American Society of Gastrointestinal Endoscopy

编者按 本文内容为美国消化内镜学会发布的有关软式内镜清洗消毒的指南, 原文参见 *Gastrointest Endosc*. 2003 Jul;58(1):1-8 或 <http://www.asge.org> 的 endoscopic practice 栏目中有关的 guideline. 我国卫生部对于加强医疗机构内镜清洗消毒工作也很重视, 发布了 2004 版的操作规范. 本译文中部分内容与规范有所差异, 如文中“25℃ 的 >2% 浓度的戊二醛消毒 20-90 min”, 规范中为“2% 戊二醛浸泡不少于 10 min”, 但作为一些原则性的建议可以作为我国专业人员的参考.

徐晓蓉, 李兆申. 软式消化内镜消毒指南. 世界华人消化杂志 2004;12(11): 2713-2716

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2713.asp>

0 引言

内镜检查对于很多消化系统疾病和肿瘤的预防、诊治作用已经众所周知. 与很多精细的医学设备一样, 内镜是一种复杂、重复使用的器械, 必须在下一个患者使用之前进行维护, 最常用的方法是严格消毒. 据报道目前与 GI 内镜检查有关的病原体传播, 都是由于不遵从清洁和消毒/无菌指南或使用不规范的消毒设备所致. 尽管已有很多有关内镜安全维护的数据发表, 但对内镜传播病原体的关注仍然使人们不断提出问题: 对不同患者间反复使用的内镜, 最好的消毒、灭菌方法是什么? 美国消化内镜学会 (ASGE) 和美国卫生流行病学协会 (SHEA) 2003 年召开会议, 由医师和护士组织、感染控制机构、联邦管理组织及公司领导的代表参与, 就这个专题展开讨论. 第 2 d 产生的共识总结了研讨会上公布的数据, 并提出了内镜消毒的建议.

1 Spaulding 医疗设备分类及其消毒等级

医疗设备分类系统最早由 E.H. Spaulding 医师提出, 主要根据其应用过程中可能产生的感染危险分类^[1], 目前已广为接受并被 FDA、疾病预防控制中心 (CDC)、流行病学家、微生物学家和专业医疗组织等采纳, 帮助确定各种医疗设备所需要消毒或灭菌的程度. 以下列出 3 类设备及其相关的消毒等级: (1) 严格: 进入正常无菌组织或血管系统的器械. 要求无菌, 即破坏所有活的微生物. 内镜系统需灭菌的如活检钳和乳头切开刀. (2) 半严格: 主要指与完整的黏膜接触而一般不穿透无菌组织的器械, 如内镜, 需要至少高

级消毒, 即破坏所有有活力的微生物、杆菌、小的或非脂病毒、中等大小或脂病毒、真菌孢子和一部分的细菌孢子. (3) 不严格: 通常不接触患者或仅接触完整皮肤, 如听诊器或患者用手推车. 这些可以按低级消毒标准清洁.

2 病原体传播

在美国, 每年有一千万次以上的消化内镜操作, 然而引起病原体传播的报道非常少. 迄今为止最全面的综述包括了 1966/1992 年发表的 281 篇文章, 共 281 次由内镜操作所致的病原体传播^[2], 每次发生都与违背当时制定的清洁和消毒指南有关, 如用不合格的液体化学杀菌剂消毒、干燥不规范、或洗消仪器有缺陷. ASGE 技术评估委员会分析自清洁与消毒专用指南应用后的 1988/1992 年的 28 次事故, 估计病原体传播的发生率约 1/180 万^[3].

自从 1993 年开始, 仅有 5 个在 GI 内镜检查中发生病原体传播的病例报道, 且发生在美国以外, 1 例单端孢食管炎由于活检钳用后灭菌不够导致^[4]; 有 4 起丙型肝炎病毒 (HCV) 传染, 每次均与违背既定的洗消规范或常规控制感染操作失误 (多剂量小瓶使用不当或注射器重复使用)^[5-7]. 控制感染措施规范化的重要性由于近年来纽约内镜中心的 HCV 爆发受到重视, 最初认为是内镜传播, 但纽约卫生部的调查发现原因并不在于内镜本身, 而是与静脉镇静操作不合格、多剂量入壶及/或针头反复使用有关 (来自纽约卫生部文件, 数据尚未发表). 标准的感染控制程序应该受到关注. 当 CDC 的卫生质量促进 (原医院感染控制) 部门综合 1980/2002 年的调查, 没有发现与内镜本身有关的感染. 1990 年以后, 卫生系统和制造厂家每年都需要向 FDA 报道与内镜、附件及其自动清洗消毒器有关的死亡、损伤或严重疾病. 对 FDA 生产商和用户设备经验 (MAUDE) 的数据库行回顾分析, 1990/2002 年共发生 7 起可能在内镜检查过程发生的传染事件. 尽管无设计良好的前瞻性研究, 但根据病例报道情况推测, 目前还是低估了内镜相关感染的发生率, GI 内镜检查发生的病原体传播可能并不罕见.

3 GI 内镜维护

软式内镜首先应当清洗, 然后至少按高级标准消毒, 这是联邦政府机构如 FDA 和 CDC^[8] 及专业组织如美国

消化内镜学会(ASGE)、美国胃肠病学院(ACG)、美国胃肠病学会(AGA)、美国内镜护士及相关技术人员协会(SGNA)、美国围手术注册护士协会(AORN)、美国感染控制和流行病专业学会(APIC)、美国检测和材料学会(ASTM)等建议的。这些机构经过讨论,逐步制定出适当的内镜消毒指南^[9-11],这些指南执行后再没有感染报道。但是,对内镜维护指南的依从性还需提高,1991年 Gorse *et al*^[12]调查了2,030位 SGNA 成员,发现他们对目前指南的依从性为67-93%。同一年,FDA和3个州的卫生部调查26个医疗机构的内镜消毒情况,发现在24%已准备给患者使用的内镜(GI镜和支气管镜)中细菌培养阳性,这些都与“消毒操作过程中的许多基本失误”有关^[13-14]。更另人关注的是,Jackson *et al*^[15]调查了19个行乙状结肠镜的家庭医师和内科医师诊所,均发现在内镜消毒指南的执行方面至少有一处不够充分。近期有2个或更多个研究提示对内镜消毒指南的依从性已经有所提高^[16-17],但一小部分内镜中心仍然不能完全按此执行。所以在内镜维护的各个环节上,都还应该努力提高对指南的依从性。

4 建议

专业组织根据实践要求有所改变,目前的文件并不是取代指南,而是补充、强调一些有事实基础并被广泛认同的方面。使用可替换部件(如保护性屏障设施、鞘、阀门等)的内镜可以提供从有选择到常规的液体消毒。用户应参照厂家的说明行适当洗消保养。

4.1 内镜室所有医疗工作人员均要接受培训、遵守标准的感染控制规范(如防范标准),还包括一些保护患者和医务人员的规范。

4.2 根据厂家指南要求每次用后检验压力/渗漏^[10-11]。

4.3 尽快拆卸内镜部件(如送水/送气和吸引按钮),将内镜和附件完全浸泡在酶洁液中^[18-19]。

4.4 手工或自动消毒之前的清洗非常重要,根据厂家说明使用完后立即用酶洁液仔细清洗整个内镜,包括按钮、管道、连接器及所有可分离部分。冲洗、刷洗所有管腔,彻底去除有机物(如血、组织等)及其他残留物,反复按动按钮使得管腔表面都可以与清洁剂接触。用软布、海绵、刷子清洗内镜外表面其他部件^[2,9-11,20-29]。

4.5 刷子应与内镜管腔的大小、部位、连接器及孔相配,使刷毛可以刷到所有的表面。清洁用具本身也要在使用后彻底清洁并消毒/灭菌^[11,24,29]。

4.6 每次用完后的洗涤剂应废弃,因为这些不是杀菌剂、不能阻止微生物的生长^[11,29]。

4.7 重复使用、且穿透黏膜屏障的内镜附件(如活检钳和其他切割器械)应机械清洗、每个患者用后均要灭菌处理(高级消毒是不够的)^[2,5,8-11,24,29-30]。

4.8 超声洗涤可以用在难于洗净的附件和内镜部分,以去除脏物和组织成分^[29]。

4.9 内镜(和附件)因接触黏膜属半严格消毒类,每个患者使用后至少要高级消毒^[2,8-11,22,24,29]。

4.10 用FDA指定的高级消毒剂/灭菌剂进行高级消毒/灭菌^[2,8-11,22,24,29-30]。

4.11 半严格类仪器的消毒时间与温度应在FDA明确规定的高级消毒范围内。一般应遵从FDA的规定,除非经一些设计严密的科学实验、由专业机构认定批准,认为其他消毒时间也能符合半严格类仪器的消毒要求。FDA规定的高级消毒是用25℃的>2%(20 mL/L)浓度的戊二醛消毒20-90 min,具体时间根据所用产品而定。然而多项科研结果和专业组织均支持用20℃、>20 mL/L浓度的戊二醛消毒20 min即有效^[1,9,22-23,26,31-43]。

4.12 选用合适的内镜消毒、清洗剂,如内镜生产商警告某些特殊消毒、清洗剂可导致功能损坏(伴或不伴外表受损)就不应使用^[44-45]。

4.13 医疗领域内消毒剂的选择和使用是会变更的,对有些在指南出台时还没有的消毒剂,那么有关人员或委员会就有责任进行筛选,因GI内镜洗消用品的确定受FDA和科学文献^[22]报道的信息指导。

4.14 内镜和其部件应完全浸泡在高级消毒剂/灭菌剂中,保证所有的管腔都被灌注。不能浸泡的内镜应立即淘汰^[9-11,22,24,29,46-48]。

4.15 如果使用自动内镜清洗-消毒机(AEWD),那么应保证内镜和组件能有效消毒(如多数AEWD不能消毒十二指肠镜的抬钳器腔道,所以这部分必须手工操作)。使用者应该从内镜和AEWD厂家获取、复习不同型号的机型的维护说明,并检验其兼容性^[9,11,24,46-49]。

4.16 如使用AEWD,根据内镜和AEWD厂家说明书的要求,应将内镜和其组件放置在消毒器中并连接好,保证所有管腔内表面都有效暴露在消毒/灭菌剂中^[11,46-48]。

4.17 如AEWD运转被打断,则无法保证高级消毒或灭菌的效果^[11]。

4.18 因AEWD设计的缺陷能影响其效果,感染控制人员应该常规复习FDA的建议和有关AEWD可能引起感染的文献报道^[47,50-53]。

4.19 高级消毒后,应用无菌、过滤水冲洗内镜和管腔,去除消毒/灭菌剂。冲洗用水每次用完就弃掉,用700-900 mL/L的乙醇或异丙醇冲管腔,然后干燥,最后的干燥步骤能极大地减少水生微生物再污染可能^[9-10,22,26,51,54-56]。

4.20 内镜储藏时应垂直悬挂(每个厂家的说明书均要求将帽、阀门、其他可拆部件卸下)^[10-11,22,57]。

4.21 内镜应以能防止污染的方式保存^[11,14,21,26,28]。

4.22 水瓶及其连接管(操作过程中用于清洁镜面和冲洗)至少应每天消毒,水瓶应装入无菌水^[10,58-61]。

4.23 保存每次检查的患者姓名、住院号(如有)、过程、内镜操作者和所用内镜(包括AEDW)的系列型号或其他证明,以方便调查^[10-11]。

4.24 对消毒/灭菌剂进行常规测试以保证其最低有效

浓度(MEC), 每天使用前应检查溶液并登记结果. 如果化学指示剂显示浓度低于 MEC, 则该溶液不能使用^[9-11,22,36].

4.25 即使浓度还能达到 MEC, 但到了重复使用期限的消毒/灭菌剂仍应废弃. 如在AEWD(或手工消毒的盆中)加入液体灭菌/高级消毒剂, 重复使用期限应该由原液的首次使用/活化时间决定, 也就是说液体灭菌/高级消毒剂池的使用不能超过其重复应用期限^[11,22,62].

4.26 使用和消毒内镜的机构应该为医疗工作者及患者提供安全的环境. 采用空气交换设施(如通风系统、排气罩)以减少人体与有毒物质(如戊二醛)接触. 化学灭菌剂的浓度不能超过允许范围(如美国政府工业卫生委员会、职业安全与健康管理局所定的标准). 有机气体吸附剂能对呼吸道的化学暴露提供保护, 但一般不提倡常规使用、更不能替代充分通气、气体交换系统和实际操作中的防范^[9-11,65-64].

4.27 内镜维护的工作人员应接受专门的洗消指导(如内镜和/或 AEWD), 以保证清洁和高级消毒或灭菌操作的规范. 这些职员的资格考试应该常规进行(如每年雇佣开始或结束时), 临时工作人员只有获得资格证明后才能进行内镜洗消操作^[9-11].

4.28 所有使用消毒化学剂的人员应受到有关其生物和化学危害性的教育.

4.29 应准备并使用个人防护措施(如手套、防护外衣、护眼镜、呼吸道保护设施), 保护工作人员免受化学物质、血液或其他潜在感染物质(OPIM)污染^[66-67].

4.30 应开发一些医疗设备, 使操作者易于鉴别内镜是否被污染或已适合患者使用.

4.31 对环境微生物的常规检验应用于内镜, 是否能确保质量还未明确.

4.32 如行环境微生物检验, 应使用标准的微生物学技术.

4.33 怀疑由感染或化学因素导致的事件发生时, 应根据调查要求收集环境标本.

4.34 内镜相关的感染应报告至: 机构中负责感染控制的人员; 相应的公共卫生部门(如根据国家法律或条例规定的国家或地方卫生部); FDA; CDC; 内镜、消毒/灭菌剂及AEWD(如有使用)的生产商^[9-10].

总之, 软式GI内镜是GI和胰胆管疾病诊疗的有效工具, 按照指南在患者使用后进行消毒维护对内镜操作的安全和成功都是非常重要的, 执行好指南能有效预防病原体的传播. 应该努力并集中资源以进一步提高对指南的依从性, 鼓励开展内镜消毒方面的研究. 这份声明被下述机构认可: 美国消化内镜学会、美国卫生流行病学学会、美国卫生组织鉴定联合会、美国胃肠病学会、美国结肠直肠外科学会、美国胃肠内镜外科学会、美国内镜护士及相关技术人员协会、美国围手术注册护士协会等. 这些机构受委托帮助FDA和生产商探讨GI器械洗消维护中有关感染控制的议题.

5 参考文献

- 1 Favero MS, Bond WW. Disinfection of medical and surgical materials. In: Block SS, editor. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:p. 881-917
- 2 Spach DH, Silverstein FE, Stamm WE. Transmission of infection by gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy. *Ann Intern Med* 1993;118:117-28
- 3 Kimmey MB, Burnett DA, Carr-Locke DL, DiMarino AJ, Jensen DM, Katon R. Transmission of infection by gastrointestinal endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1993;36:885-888
- 4 Lo Passo C, Pernice I, Celeste A, Perdichizzi G, Todaro-Luck F. Transmission of Trichosporon asahii oesophagitis by a contaminated endoscope. *Mycoses* 2001;44:13-21
- 5 Bronowicki JP, Venard V, Botte C, Monhoven N, Gastin I, Chone L, Hudziak H, Rihn B, Delanoe C, LeFaou A, Bigard MA, Gaucher P, Rhin B. Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med* 1997;337:237-240
- 6 Le Pogam S, Gondeau A, Bacq Y. Nosocomial transmission of hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1999;131:794
- 7 Tennenbaum R, Colardelle P, Chochon M, Maisonneuve P, Jean F, Andrieu J. Hepatitis C after retrograde cholangiography. *Gastroenterol Clin Biol* 1993;17:763-764
- 8 Garner JS, Favero MS. CDC Guideline for Handwashing and Hospital Environmental Control, 1985. *Infect Control* 1986;7:231-243
- 9 Reprocessing of flexible gastrointestinal endoscopes. American Society for Gastrointestinal Endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1996;43:540-545
- 10 Alvarado CJ, Reichelderfer M. APIC guideline for infection prevention and control in flexible endoscopy. Association for Professionals in Infection Control. *Am J Infect Control* 2000;28:138-155
- 11 Society of Gastroenterology Nurses and Associates. Standards of infection control in reprocessing of flexible gastrointestinal endoscopes. *Gastroenterol Nurs* 2000;23:172-179
- 12 Gorse GJ, Messner RL. Infection control practices in gastrointestinal endoscopy in the United States: a national survey. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991;12:289-296
- 13 Kaczmarek RG, Moore RM Jr, McCrohan J, Goldmann DA, Reynolds C, Caquelin C, Israel E. Multi-state investigation of the actual disinfection/sterilization of endoscopes in health care facilities. *Am J Med* 1992;92:257-261
- 14 Reynolds CD, Rhinehart E, Dreyer P, Goldmann DA. Variability in reprocessing policies and procedures for flexible fiberoptic endoscopes in Massachusetts hospitals. *Am J Infect Control* 1992;20:283-290
- 15 Jackson FW, Ball MD. Correction of deficiencies in flexible fiberoptic sigmoidoscope cleaning and disinfection technique in family practice and internal medicine offices. *Arch Fam Med* 1997;6:578-582
- 16 Cheung RJ, Ortiz D, DiMarino AJ Jr. GI endoscopic reprocessing practices in the United States. *Gastrointest Endosc* 1999;50:362-368
- 17 Muscarella LF. Current instrument reprocessing practices. Results of a national survey. *Gastroenterol Nurs* 2001;24:253-260
- 18 Merritt K, Hitchins VM, Brown SA. Safety and cleaning of medical materials and devices. *J Biomed Mater Res* 2000;53:131-136
- 19 Babb JR, Bradley CR. Endoscope decontamination: where do we go from here? *J Hosp Infect* 1995;30(Suppl):543-551
- 20 Hanson PJ, Gor D, Clarke JR, Chadwick MV, Nicholson G, Shah N, Gazzard B, Jeffries DJ, Gaya H, Collins JV. Contamination of endoscopes used in AIDS patients. *Lancet* 1989;2:86-88
- 21 Vesley D, Norlien KG, Nelson B, Ott B, Streifel AJ. Significant factors in the disinfection and sterilization of flexible endoscopes. *Am J Infect Control* 1992;20:291-300
- 22 Rutala WA. APIC guideline for selection and use of disinfectants. 1994, 1995, and 1996 APIC Guidelines Committee. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. *Am J Infect Control* 1996;24:313-342
- 23 Urayama S, Kozarek RA, Sumida S, Raltz S, Merriam L, Pethigal P. Mycobacteria and glutaraldehyde: is high-level disinfection of endoscopes possible? *Gastrointest Endosc* 1996;43:451-456

- 24 BSG. Cleaning and disinfection of equipment for gastrointestinal endoscopy. Report of a Working Party of the British Society of Gastroenterology Endoscopy Committee. *Gut* 1998; 42:585-593
- 25 Chu NS, McAlister D, Antonoplos PA. Natural bioburden levels detected on flexible gastrointestinal endoscopes after clinical use and manual cleaning. *Gastrointest Endosc* 1998;48:137-142
- 26 Cronmiller JR, Nelson DK, Salman G, Jackson DK, Dean RS, Hsu JJ, Kim CH. Antimicrobial efficacy of endoscopic disinfection procedures: a controlled, multifactorial investigation. *Gastrointest Endosc* 1999;50:152-158
- 27 Kovacs BJ, Chen YK, Kettering JD, Aprecio RM, Roy I. High-level disinfection of gastrointestinal endoscopes: are current guidelines adequate? *Am J Gastroenterol* 1999;94:1546-1550
- 28 Vesley D, Melson J, Stanley P. Microbial bioburden in endoscope reprocessing and an in-use evaluation of the high-level disinfection capabilities of Cidex PA. *Gastroenterol Nurs* 1999;22:63-68
- 29 ESGE. Guidelines on cleaning and disinfection in GI endoscopy. Update 1999. The European Society of Gastrointestinal Endoscopy. *Endoscopy* 2000;32:77-80
- 30 Graham DY, Osato MS. Disinfection of biopsy forceps and culture of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1422-1423
- 31 Collins FM. Kinetics of the tuberculocidal response by alkaline glutaraldehyde in solution and on an inert surface. *J Appl Bacteriol* 1986;61:87-93
- 32 Collins FM. Bactericidal activity of alkaline glutaraldehyde solution against a number of atypical mycobacterial species. *J Appl Bacteriol* 1986;61:247-251
- 33 Ascenzi JM, Ezzell RJ, Wendt TM. A more accurate method for measurement of tuberculocidal activity of disinfectants. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:2189-2192
- 34 Collins FM. Use of membrane filters for measurement of mycobactericidal activity of alkaline glutaraldehyde solution. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:737-739
- 35 Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kennedy ME. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2234-2239
- 36 Cole EC, Rutala WA, Nessen L, Wannamaker NS, Weber DJ. Effect of methodology, dilution, and exposure time on the tuberculocidal activity of glutaraldehyde-based disinfectants. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:1813-1817
- 37 Hanson PJ, Gor D, Jeffries DJ, Collins JV. Elimination of high titre HIV from fibreoptic endoscopes. *Gut* 1990;31:657-659
- 38 Hanson PJ, Jeffries DJ, Collins JV. Viral transmission and fibreoptic endoscopy. *J Hosp Infect* 1991;18 (Suppl A):136-140
- 39 Rutala WA, Cole EC, Wannamaker NS, Weber DJ. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by 14 hospital disinfectants. *Am J Med* 1991;91:267S-271S
- 40 Hanson PJ, Chadwick MV, Gaya H, Collins JV. A study of glutaraldehyde disinfection of fibreoptic bronchoscopes experimentally contaminated with *Mycobacterium tuberculosis*. *Hosp Infect* 1992;22:137-142
- 41 Best M, Springthorpe VS, Sattar SA. Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: studies with a mixture of five types of microorganisms. *Am J Infect Control* 1994;22:152-162
- 42 Jackson J, Leggett JE, Wilson DA, Gilbert DN. *Mycobacterium gordonae* in fiberoptic bronchoscopes. *Am J Infect Control* 1996;24:19-23
- 43 Chanzy B, Duc-Bin DL, Rousset B, Morand P, Morel-Baccard C, Marchetti B, Fauconnier J, Mallaret MR, Calop J, Zarski JP, Seigneurin JM. Effectiveness of a manual disinfection procedure in eliminating hepatitis C virus from experimentally contaminated endoscopes. *Gastrointest Endosc* 1999;50:147-151
- 44 Fuselier HA Jr, Mason C. Liquid sterilization versus high level disinfection in the urologic office. *Urology* 1997;50:337-340
- 45 Rutala WA, Weber DJ. Disinfection of endoscopes: review of new chemical sterilants used for high-level disinfection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20:69-76
- 46 Rutala WA, Weber DJ. Importance of lumen flow in liquid chemical sterilization. *Am J Infect Control* 1999;20:458-459
- 47 Sorin M, Segal-Maurer S, Mariano N, Urban C, Combast A, Rahal JJ. Nosocomial transmission of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* following bronchoscopy associated with improper connection to the Steris System 1 processor. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22:409-413
- 48 CDC. Bronchoscopy-related infections and pseudoinfections—New York, 1996 and 1998. *MMWR* 1999;48:557-560
- 49 Struelens MJ, Rost F, Deplano A, Maas A, Schwam V, Serruys E, Cremer M. *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae bacteremia after biliary endoscopy: an outbreak investigation using DNA macrorestriction analysis. *Am J Med* 1993;95:489-498
- 50 O'Connor HJ, Babb JR, Ayliffe GA. *Pseudomonas aeruginosa* infection during endoscopy. *Gastroenterology* 1987;93:1451
- 51 Alvarado CJ, Stolz SM, Maki DG. Nosocomial infections from contaminated endoscopes: a flawed automated endoscope washer. An investigation using molecular epidemiology. *J Med* 1991;91:272S-280S
- 52 CDC. Nosocomial infection and pseudoinfection from contaminated endoscopes and bronchoscopes—Wisconsin and Missouri. *MMWR* 1991;40:675-678
- 53 Fraser VJ, Jones M, Murray PR, Medoff G, Zhang Y, Wallace RJ Jr. Contamination of flexible fiberoptic bronchoscopes with *Mycobacterium chelonae* linked to an automated bronchoscope disinfection machine. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(4 Pt 1):853-855
- 54 Gerding DN, Peterson LR, Vennes JA. Cleaning and disinfection of fiberoptic endoscopes: evaluation of glutaraldehyde exposure time and forced-air drying. *Gastroenterology* 1982;83:613-618
- 55 Allen JJ, Allen MO, Olson MM, Gerding DN, Shanholtzer CJ, Meier PB, Vennes JA, Silvis SE. *Pseudomonas* infection of the biliary system resulting from use of a contaminated endoscope. *Gastroenterology* 1987;92:759-763
- 56 Alfa MJ, Sitter DL. In-hospital evaluation of contamination of duodenoscopes: a quantitative assessment of the effect of drying. *J Hosp Infect* 1991;19:89-98
- 57 Noy MF, Harrison L, Holmes GK, Cockel R. The significance of bacterial contamination of fibreoptic endoscopes. *J Hosp Infect* 1980;1:53-61
- 58 Meenhorst PL, Reingold AL, Groothuis DG, Gorman GW, Wilkinson HW, McKinney RM, Feeley JC, Brenner DJ, van Furth R. Water-related nosocomial pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 10. *J Infect Dis* 1985;152:356-364
- 59 Wright EP, Collins CH, Yates MD. *Mycobacterium xenopi* and *Mycobacterium kansasii* in a hospital water supply. *J Hosp Infect* 1985;6:175-178
- 60 Rutala WA, Weber DJ. Water as a reservoir of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:609-616
- 61 Wallace RJ Jr, Brown BA, Griffith DE. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 1998;52:453-490
- 62 Nelson DB, Barkun AN, Block KP, Burdick JS, Ginsberg GG, Greenwald DA, Kelsey PB, Nakao NL, Slivka A, Smith P, Vakil N. Technology status evaluation report. Transmission of infection by gastrointestinal endoscopy. May 2001. *Gastrointest Endosc* 2001;54:824-828
- 63 Rutala WA, Hamory BH. Expanding role of hospital epidemiology: employee health—chemical exposure in the health care setting. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989;10:261-2661
- 64 OSHA. Air contaminants final rule. *Federal Register* 1993; 58: 35338-35351
- 65 Weber DJ, Rutala WA. Occupational risks associated with the use of selected disinfectants and sterilants. In: Rutala WA, eds. Disinfection, sterilization, and antisepsis in healthcare. Champlain: Polyscience Publications, 1998: 211-226
- 66 OSHA. Occupational exposure to bloodborne pathogens: final rule. *Federal Register* 1991;56:64003-64182
- 67 arr-Locke DL, Conn MI, Faigel DO, Laing K, Leung JW, Mills MR, Nelson DB, Smith P, Tarnasky PR, Waxman. Personal protective equipment. *Gastrointest Endosc* 1999;49:854-857

(徐晓蓉 译, 李兆申 校, 上海市长海路174号

上海市 200433

徐晓蓉, 主治医师, 博士, 长海医院消化内科. xrxuchxh.com)

组织取样与分析

American Society of Gastrointestinal Endoscopy

编者按 组织取样与分析是消化内镜在临床常见情况下的应用指南之一。美国消化内镜学会制定了该指南。在撰写这一指南的过程中,除MEDLINE检索到的文章外,还参考了一些专家推荐的文章。内镜的合理应用指南基于目前一些重要的综述和专家共识,还需要大量的临床对照研究加以确定和必要的修订。临床实际情况和指南有所差异时应适当调整。

该指南的目的是为消化内镜检查中组织分析(活检、圈套切除、细胞学和培养)提供实践基础。

蔡振霖, 刘枫, 李兆申. 组织取样与分析. 世界华人消化杂志 2004;12(11): 2717-2721

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2717.asp>

0 引言

组织病理学评价有助于区分恶性肿瘤、炎症和感染性疾病。组织活检标本取自内镜检查中发现的可疑病变部位。对内镜检查看似正常的部位进行组织病理分析仍然能提供有意义的信息。组织分析有时也用来验证先前内镜检查结果及治疗效果。当内镜检查发现是一特异性病变时,如果治疗没帮助,可不用组织分析。对有潜在出血倾向的患者,如凝血障碍,应禁止行组织活检。

1 技术

许多技术和设备可用来获得足够的组织样本。用活检钳夹取活检是最常用的组织取样方法。多点活检有助于提高诊断的阳性率。另外活检块大小、活检部位和定位、固定、染色都很重要^[1-2]。活检钳活检标本一般都是黏膜组织,有时跳跃式活检也能取到黏膜下组织。然而这些活检钳都需要有一个至少 3.6 mm 大小的活检孔道,可活检 2-3 倍活检孔道大小的面积,但通常不能取到深层组织^[3]。细胞刷检是活检钳很有意义的附属装置,有助于恶性肿瘤和炎症的诊断^[4]。圈套摘除有助于大息肉的摘除^[5]。联合应用各种技术有助于提高诊断的精确性^[6]。超声内镜引导下FNA有助于上皮下和胃肠道外组织如淋巴结和胰腺肿块的取样,在美国消化内镜学会情况评价报告“超声内镜中的取样”中将详述这方面内容^[7]。

2 食管

除了少数因梗阻而不能获得足够视野对病变部位进行活检,95%的食管恶性肿瘤均可由活检诊断,活检需要取 8-10 块组织^[1],活检时加用细胞刷检有助于提高

诊断的阳性率^[8-9]。最常见的食管炎症是反流性食管炎,见于胃食管反流病患者。内镜结合组织分析能发现 Barrett's 食管,并能排除炎症及表现类似胃食管反流病的恶性肿瘤^[10]。内镜下见到的侵蚀性改变与组织学高度相符,但孤立性红斑并不是诊断食管炎的可靠指标。相反,那些有反流症状而内镜检查表面看似正常的食管黏膜,组织学检查却是异常的(多型核细胞和嗜酸细胞浸润)^[10-11]。肉眼异常的食管黏膜活检及刷检标本,在诊断 Barrett's 食管时,通常要排除恶性肿瘤、炎症和自身免疫性疾病^[10,12]。

Barrett's 食管是指正常鳞状上皮黏膜被化生的小肠黏膜上皮取代,需由内镜活检才能诊断^[13]。Barrett's 食管是食管癌的高危因素,需要严密随访^[14]。通过特殊染色(阿利辛蓝)检查有无杯状细胞,能鉴别无刷状缘的柱状上皮和胃黏膜^[15]。严重溃疡性食管炎往往掩盖了原先存在的 Barrett's 黏膜,而且炎症导致的非典型增生和异型增生很难鉴别。这些情况下需要积极治疗食管炎,才能进一步明确组织病理学结果^[13,15-16]。

活检也用来诊断组织异型增生和腺癌。当怀疑组织异型增生时应额外对异常黏膜取 4 个象限,每隔 1-2 cm 进行活检^[17-18]。高度异型增生者每 2 cm 活检较每 1 cm 活检可能会漏诊 50% 的恶性肿瘤^[18]。尽管已出现了较大容量的活检钳,但一个回顾性研究显示:分 4 个象限每隔 2 cm 取活检,恶性肿瘤的漏诊率相同,结果分别是大容量活检钳(4/12, 33%),标准容量活检钳(6/16, 38%)^[19]。提倡转动吸引技术,即张开的活检钳靠近内镜头端,活检钳往管壁前进并转动抽吸再夹紧便取得活检组织^[17]。那些高度异型增生者需选择食管切除术,这种技术需 3-6 mo 的间隔,能准确诊断肿瘤,但 96% 限于黏膜层^[17-18]。

高清晰度放大内镜和亚甲蓝色素内镜通过直接定位活检有助于短片段 Barrett's 食管的诊断^[19-23]。有报告用碘溶液和亚甲蓝色素内镜能提高 Barrett's 食管区域内鳞状细胞癌和瘤分布区的发现率^[21,24-26]。亚甲蓝在检测 Barrett's 食管的价值以前就提出过。用流式细胞计量和 DNA 分析能确定哪些患者属非整倍体、多倍体或 17p (p53) 杂合缺失,从而有助于预测患癌的风险^[27-29]。

食管散在病变可行内镜黏膜切除术。这种技术是在黏膜下注射盐水使病变隆起,然后用圈套烧灼切除^[30]。该技术已成功应用于 Barrett's 食管的瘤性病变和良性食管肿瘤切除^[31-33]。

感染性食管炎常见于免疫功能低下患者,如接受

系统性免疫治疗者、吸入激素者、肿瘤患者(尤其化疗患者)以及有糖尿病或艾滋病病史患者^[34]。最常见的病原体是念珠菌属、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒。霉菌性食管炎内镜表现是黏膜炎性白斑,刷检细胞学和活检有助于诊断,但刷检细胞学更敏感^[35-36]。病毒性食管炎表现为溃疡,活检标本需取自溃疡中央和边缘部位。组织病理学检查有助于诊断,但艾滋病患者需多点活检(多达10块组织)^[17]。病毒培养是最权威的诊断,但对于巨细胞病毒,组织学更敏感^[35, 37-39]。

3 胃

胃肿瘤可表现为溃疡性、息肉样、黏膜下损害或者胃壁增厚。足够的组织取样有时需要几种技术联合使用。对息肉样肿块和溃疡行夹取活检是最有效的诊断方法^[1]。对溃疡边缘4个象限及溃疡基底部多点活检是必要的^[40]。加用刷检细胞学检查能提高阳性率^[41]。对息肉样病变应进行活检,技术许可情况下对大于2 cm的息肉应摘除^[42]。胃息肉切除比肠息肉切除危险性大,因此术后应常规抑酸治疗^[43]。

内镜黏膜切除术用来对胃壁增厚的组织取样,也用来治疗早期胃癌。早期胃癌的内镜黏膜切除术适用于经超声内镜或内镜检查肿瘤直径小于20 mm并局限于黏膜者。切除方法是内镜下在病变处黏膜下注射液体,然后进行切除(见内镜下黏膜切除术技术状况评价报告)^[30]。

消化性溃疡和胃黏膜组织相关淋巴瘤患者及潜在发展为胃癌患者(如家族或个人有胃癌史)应该进行幽门螺杆菌检查^[44-47]。基于组织的检查来源于组织活检取得的胃黏膜。这些检查包括尿素酶活力(快速尿素酶试验)、典型弯曲菌的组织学检查和培养^[47-48]。在未治疗的患者,活检标本应取自胃窦小弯靠近胃角处^[49]。快速尿素酶试验具有价廉、特异性高、能在内镜检查室里检查且1 h后出结果等优点^[48]。但快速尿素酶试验敏感性低,结果阴性时应选择其他方法检查^[50]。对本标本进行组织学检查时应注意有无炎症细胞和典型弯曲菌,后者检测需要特殊染色^[48, 51-52]。组织学检查发现有显著胃炎细胞浸润而未发现细菌时,应快速进行其他检查,比如血清学检查、尿素呼气试验或粪抗原检测。考虑到有抗菌剂耐药时可进行细菌培养,但敏感性较差且比较昂贵。最近接受质子泵抑制剂及抗生素治疗的患者及消化道出血者,基于组织的检查敏感性降低,对这些患者,应在胃窦部及胃体部进行多点活检,快速尿素酶试验阴性时应选择其他方法检查^[53-56]。若病情允可应停止质子泵抑制剂治疗1 wk后进行Hp检查^[57]。

4 小肠

对怀疑有小肠疾病的患者进行活检是必须检查之一。经口活检组织传统上取自屈氏韧带区域。现在更常用的是内镜活检,具有操作时间短、患者更舒适、能直接多点活检等优点^[58]。弥散性黏膜病变者应在十二指肠球部远

端至少取3块活检组织以免误诊为Brunner's腺^[59-60]。有些疾病内镜表现为斑片状病变,在小肠远端多点活检要求更长和更小口径的内镜。即使肉眼看似正常的组织,活检也有助于诊断^[61]。小肠活检对于精确诊断肠黏膜吸收不良综合征具有参考标准。怀疑腹腔疾病时,仍然需要进行小肠活检,即使血液学筛选检查(如谷氨酰转氨酶及肌内膜抗体)结果阳性^[59, 62]。血液学检查应在治疗前完成,否则,检查结果会出现假阳性。

小肠感染性疾病的诊断需靠组织学检查。蓝氏贾第鞭毛虫和其他许多原生虫病原体和小肠黏膜炎性改变有关。在上皮表面发现成熟体、滋养体或其生活周期组成部分能作出特异性诊断。有些患者内镜表现类似嗜酸细胞性胃肠炎,故嗜酸细胞性胃肠炎诊断需排除寄生虫感染^[22, 26]。

免疫缺陷患者包括器官移植后及HIV感染者,在小肠活检组织中常发现隐匿性病原体如贝氏等孢子球虫、隐孢子虫、环孢菌及微孢子等。在免疫缺陷患者小肠活检组织中还可发现巨细胞病毒、真菌如念珠菌和组织胞质菌及鸟-胞内分支杆菌复合群^[22]。2块组织需系列活检时建议使用大的杯状活检钳,而不用传统活检钳,在退出活检钳前系列钳取(双咬合技术)。建议用针把活检标本从活检钳上移到固定液里,避免采取抖动的方式移到固定瓶里,以免黏附在上皮表面的渗出液丢失^[63]。

十二指肠肿瘤应用内镜和活检诊断。选用前视或侧视镜取样由肿瘤大小及位置决定。

33-100%的家族性腺瘤性息肉病患者有十二指肠、空肠和胃息肉^[64-69]。家族性腺瘤性息肉病患者一般是胃底腺息肉,没有恶性变倾向,但仍需活检除外腺瘤。而十二指肠息肉一般是典型的腺瘤性,首先出现在壶腹部或壶腹周围区域。同时或先后出现的上消化道息肉有助于对结肠息肉的识别^[70]。由壶腹周围腺瘤发展成的腺癌是公认的实体瘤,除结肠直肠癌外,他是家族性腺瘤性息肉病患者最常见死因,应该进行严密随访^[68-71]。有个案报告乳头部位活检会引起胰腺炎,尽管如此,内镜活检或远离乳头的十二指肠腺瘤摘除相关的并发症罕见^[72-73]。

5 大肠

以前的指南已经概述了大肠息肉和炎症性肠病患者结肠镜检查 and 活检的指征^[74-76]。肉眼看到的病变是组织病理学评价的保证。如果病变太多而不能逐一摘除,应进行有代表性的取样分析。乙状结肠镜筛查发现的小息肉应摘除活检,较大的息肉在随后的结肠镜检查时摘除。检出腺瘤或癌应进行全结肠镜检查。有报告乙状结肠镜检出的增生性息肉的重要性存在争议^[77-78]。大多数美国胃肠病学家认为这些增生性息肉不是近段肠管肿瘤形成的危险因素。

内镜和活检能区别不同原因引起的大肠炎,能确

定累及肠管的程度,有助于炎症性肠病的治疗.从急性期血性腹泻患者肠管获取的活检标本有助于急性自限性大肠炎与初发或复发的慢性溃疡性结肠炎及缺血性结肠炎鉴别^[79-80].回肠末端活检有助于克罗恩病、感染性回肠炎及淋巴样结节性增生的诊断^[81].溃疡性结肠炎及克罗恩病都是大肠癌的危险因素.在其病程8 a时患癌危险性开始增加^[82-83].这些患者应定期随访.仅有左半结肠病变者一般在病程15 a时患癌危险性增加.全大肠炎患者常用活检方法是每隔10 cm肠管在肠壁的4个象限上各取活检,在下段的25 cm开始,每5 cm取活检.左半结肠炎患者近段肠壁也应活检以重新评估疾病程度^[84-86].

慢性结肠炎异型增生处活检方法有所改进.当异型增生的肿块性病变较大、不规则伴狭窄时,应外科手术处理.大肠炎肠段发现典型的腺癌时应摘除,且其周边黏膜应活检.腺瘤完全摘除而周边黏膜活检正常时,可认为腺瘤是散发性的,不需进一步治疗,随访即可^[74, 86-88].

慢性腹泻患者结肠镜检查大体看起来正常时,很难确定在哪里进行活检以及需要活检几块组织.显微镜下大肠炎见于慢性水样腹泻而内镜及微生物检查正常的患者.可屈性乙状结肠镜检查取样的活检组织检查足以诊断这种疾病^[89-91].

总之,组织取样对于鉴别恶性肿瘤、炎症及感染性疾病是有益的.组织取样技术包括活检钳夹取、刷检细胞学及圈套摘除和FNA等.对于恶性肿瘤病变最多应取8-10块组织.对Barrett's食管患者应有规则的活检以评价异型增生程度.对高度异型增生的Barrett's食管患者应在管壁的4个象限及每隔1-2 cm取活检,有利肿瘤的发现.内镜黏膜切除术可用来切除恶性及恶性变前的黏膜病变.感染性病变更应多点活检,存在溃疡者,在溃疡中心及周围都应取样.刷检及病毒培养是附属技术.胃组织学检查及快速尿素酶试验能确定有无Hp感染.对未治疗的患者在胃角部进行取样, Hp检出率较高.治疗过或正在接受质子泵抑制剂及抗生素治疗者,应在胃底及胃体部活检.如果可行,胃息肉应广泛取样或摘除.胃息肉摘除术较结肠息肉摘除术出血风险大,术后建议抑酸治疗.腹泻及腹腔疾病者建议在小肠随机活检.十二指肠腺瘤呈散发性或者与家族性腺瘤性息肉病有关,如果可行,应取样或摘除.结肠病变应在内镜下切除(息肉切除术,内镜下黏膜切除术),病变太大或不能切除时应取样.对急性大肠炎患者进行活检取样有助查找病因.对慢性大肠炎患者严密观察有利检出使患癌风险增加的异型增生病变.慢性腹泻患者即使结肠黏膜肉眼观察正常,随机活检有时也能发现显微镜下大肠炎.

6 参考文献

- Graham DY, Schwartz JT, Gain GD, Gyorkey F. Prospective evaluation of biopsy number in the diagnosis of esophageal and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 1982;82:228-231
- Hatfield ARW, Slavin G, Segal AW, Levi AJ. Importance of the site of endoscopic gastric biopsy in ulcerating lesions of the stomach. *Gut* 1975;16:884-886
- Levine DS, Blount PL, Rudolph RE, Reid BJ. Safety of a systematic biopsy protocol in patients with Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1152-1157
- Cook JJ, de Carle DJ, Haneman B, Hunt DR, Talley NA, Miller D. The role of brushing cytology in the diagnosis of gastric malignancy. *Acta Cytologica* 1988;32:461-464
- Panish IF. Management of patients with polypoid lesions of the colon-current concepts and controversies. *Am J Gastroenterol* 1979;71:315-324
- Graham DY, Tabibian N, Michaelitz PA, Kinner BM, Schwartz JT, Heiser MC. Endoscopic needle biopsy: a comparative study of forceps biopsy, two different types of needles and salvage cytology in gastrointestinal cancer. *Gastrointest Endosc* 1989;35:207-209
- ASGE. Tissue sampling during endosonography. *Gastrointest Endosc* 1998;47:576-578
- Young JA, Hughes HE, Lee FD. Evaluation of endoscopic brush and biopsy touch smear cytology and biopsy histology in the diagnosis of carcinoma of the lower esophagus and cardia. *J Clin Pathol* 1980;33:811-814
- Winawer SJ, Sherlock P, Belladonna JA, Melamed M, Beattie E Jr. Endoscopic brush cytology in esophageal cancer. *JAMA* 1975;323:1358-1364
- Ippoliti AF. Esophageal biopsy. *Gastrointest Clin N Am* 2000;10:713-722
- Tummala V, Barwick KW, Sontag SJ, Vlahcevic RZ, McCallum RW. The significance of intraepithelial eosinophils in the histologic diagnosis of gastroesophageal reflux. *Am J Clin Pathol* 1987;87:43-48
- Faigel DO, Fennerty MB. Miscellaneous diseases of the esophagus. In: Yamada T, editor. *Textbook of gastroenterology*. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 1999. p: 1304-1325
- Ertan A, Younes M. Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 2000;45:1670-1673
- Provenzale D, Schmitt C, Wong JB. Barrett's esophagus: a new look at surveillance based on emerging estimates of cancer risk. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2043-2053
- Weinstein WM, Ippoliti AF. The diagnosis of Barrett's esophagus: goblets, goblets, goblets. *Gastrointest Endosc* 1996;44:91-95
- Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Roth G, Surawicz CM, Van Belle G. Observer variation in the diagnosis of high grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Hum Pathol* 1988;19:166-178
- Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, Rabinovitch PS, Rusch VW, Reid BJ. An Endoscopic biopsy protocol can differentiate highgrade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterol* 1993;105:40-50
- Reid BJ, Blount PL, Feng Z, Levine DS. Optimizing endoscopic biopsy detection of early cancers in Barrett's high grade dysplasia. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3098-3096
- Falk GW, Rice TW, Goldblum JR, Richter JE. Jumbo biopsy forceps protocol still misses unsuspected cancer in Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Gastrointest Endosc* 1999;49:170-176
- Guelrud M, Herrera I, Essenfeld H, Castro J. Enhanced magnifying endoscopy: a new technique to identify specialized intestinal metaplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2001;53:559-565
- Canto MIF, Setrakian S, Willis J, Chak A, Petras R, Powe NR. Methylene blue-directed biopsies improve detection of intestinal metaplasia and dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2000;51:560-568
- Sharma P, Topalovski M, Mayo MS, Weston AP. Methylene blue chromoendoscopy for detection of short-segment Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2001;54:289-293
- Wo JM, Ray MB, Mayfield-Stokes S, Al-Sabbagh G, Gebrail F, Slone SP. Comparison of methylene blue-directed biopsies and conventional biopsies in the detection of intestinal metaplasia and dysplasia in Barrett's esophagus: a preliminary study. *Gastrointest Endosc* 2001;54:294-301

- 24 Tincani AJ, Brandalise N, Altemani A, Scanavini RC, Valerio JB, Lage HT. Diagnosis of superficial esophageal cancer and dysplasia using endoscopic screening with a 2% lugol dye solution in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 2000;22:170-174
- 25 Canto MI. Methylene blue chromoendoscopy for Barrett's esophagus: coming soon to your GI unit? *Gastrointest Endosc* 2001;54:403-409
- 26 Wong RKH, Horwhat JD, Maydonovitch CL. Sky blue or murky waters: the diagnostic utility of methylene blue. *Gastrointest Endosc* 2001;54:409-413
- 27 Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabinovitch. Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1669-1676
- 28 Reid BJ, Prevo LJ, Galipeau PC, Sanchez CA, Longton G, Levine DS. Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus II: baseline 17p (p53) loss of heterozygosity identifies a patient subset at increased risk for neoplastic progression. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2839-2848
- 29 Rabinovitch PS, Longton G, Blount PL, Levine DS, Reid BJ. Predictors of progression in Barrett's esophagus III: baseline flow cytometric variables. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3071-3083
- 30 Nelson DB, Block KP, Bosco JJ, Burdick JS, Curtis WD, Faigel DO. Endoscopic mucosal resection. *Gastrointest Endosc* 2000;52:860-863
- 31 Ell C, May A, Gossner L, Pech O, Gunter E, Mayer G. Endoscopic mucosal resection of early cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterol* 2000;118:670-677
- 32 Waxman I, Saitoh Y, Raju GS, Watari J, Yokota K, Reeves AL, Kohgo Y. High-frequency probe EUS-assisted endoscopic mucosal resection: a therapeutic strategy for submucosal tumors of the GI tract. *Gastrointest Endosc* 2000;55:44-49
- 33 Nijhawan PK, Wang KK. Endoscopic mucosal resection for lesions with endoscopic features suggestive of malignancy and highgrade dysplasia within Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2000;52:328-332
- 34 Wilcox CM. Esophageal infections, including disorders associated with AIDS. In: Yamada T, editor. *Textbook of gastroenterology*. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 1999. p: 1263-1277
- 35 Wilcox CM, Schwartz DA. Endoscopic-pathologic correlates of Candida esophagitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Dig Dis Sci* 1996;41:1337-1345
- 36 Kods BE, Wickremesinghe C, Kozinn PJ, Iswara K, Goldberg PK. Candida esophagitis: a prospective study of 27 cases. *Gastroenterology* 1976;71:715-719
- 37 Wilcox CM, Straub RF, Schwartz DA. A prospective evaluation of biopsy number for the diagnosis of viral esophagitis in patients with HIV infection and esophageal ulcer. *Gastrointest Endosc* 1996;44:587-593
- 38 McBane RD, Gross JR Jr. Herpes esophagitis: clinical syndrome, endoscopic appearance, and diagnosis in 23 patients. *Gastrointest Endosc* 1991;37:600-603
- 39 Goodgame RW, Genta RM, Estrada R, Demmler G, Buffone G. Frequency of positive tests for cytomegalovirus in AIDS patients: endoscopic lesions compared with normal mucosa. *Am J Gastroenterol* 1993;88:338-343
- 40 Hatfield ARW, Slavin G, Segal AW, Levi AJ. Importance of the site of endoscopic gastric biopsy in ulcerating lesions of the stomach. *Gut* 1975;16:884-886
- 41 Cook IJ, de Carle DJ, Haneman B, Hunt DR, Talley NA, Miller D. The role of brushing cytology in the diagnosis of gastric malignancy. *Acta Cytol* 1988;32:461-464
- 42 Ginsberg GG, Al-Kawas FH, Fleischer DE, Reilly HF, Benjamin SB. Gastric polyps: relationship of size and histology to cancer risk. *Am J Gastroenterol* 1996;91:714-717
- 43 ReMine SG, Hughes RW, Weiland LH. Endoscopic gastric polypectomies. *Mayo Clinic Proc* 1981;56:371-375
- 44 Morgner A, Bayerdorffer E, Neubauer A, Stolte M. Malignant tumors of the stomach. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 2000;29:593-607
- 45 Ebert MP, Leodolter A, Malfertheiner P. Novel strategies in the prevention of gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1569-1571
- 46 Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *BMJ* 1998;316:1507-1510
- 47 Peterson WL, Fendrick AM, Cave DR, Peura DA, Garabedian-Ruffalo SM, Laine L. *Helicobacter pylori* related disease: guidelines for testing and treatment. *Arch Intern Med* 2000;160:1285-1291
- 48 Cutler AF, Havstad S, Ma CK, Blaser MJ, Perez-Perez GI, Schubert TT. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1995;109:136-141
- 49 Genta RM, Graham DY. Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: a topographic study of *H pylori* density and distribution. *Gastrointest Endosc* 1994;40:342-345
- 50 Hahn M, Fennerty MB, Corless CL, Magaret M, Lieberman DA, Faigel DO. Non-invasive tests as a substitute for histology in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gastrointest Endosc* 2000;52:20-26
- 51 Faigel DO, Furth EE, Childs M, Goin J, Metz DC. Histological predictors of active *Helicobacter pylori* gastritis. *Dig Dis Sci* 1996;41:937-943
- 52 Laine L, Lewin DN, Naritoku W, Cohen H. Prospective comparison of H&E, Giemsa, and Genta stains for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastrointest Endosc* 1997;45:463-467
- 53 Logan RPH, Walker MM, Misiewicz JJ, Gummett PA, Karim QN, Baron JH. Changes in the intragastric distribution of *Helicobacter pylori* during treatment with omeprazole. *Gut* 1995;36:12-16
- 54 Graham DY, Genta R, Evans DG, Reddy R, Clarridge JE, Olson CA. *Helicobacter pylori* does not migrate from the antrum to the corpus in response to omeprazole. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2120-2124
- 55 Laine L, Suchower L, Johnson E, Ronca P, Neil G. Accuracy of CLOtest after *Helicobacter pylori* therapy. *Gastrointest Endosc* 1998;47:250-253
- 56 Laine L, Sugg J, Suchower L, Neil G. Endoscopic biopsy requirements for post-treatment diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastrointest Endosc* 2000;51:664-669
- 57 Midolo P, Marshall BJ. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori* urease tests. *Gastroenterol Clin North Am* 2000;29:871-878
- 58 Achkar E, Carey WD, Petras R, Sivak MV Jr, Revta R. Comparison of suction capsule and endoscopic biopsy of small bowel mucosa. *Gastrointest Endosc* 1986;32:278-281
- 59 Freeman HJ. Small intestinal mucosal biopsy for investigation of diarrhea and malabsorption in adults. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2000;10:739-753
- 60 Freeman HJ, Chiu BK. Small bowel malignant lymphoma complicating celiac sprue and the mesenteric lymph node cavitation syndrome. *Gastroenterology* 1986;90:2008-2112
- 61 Lewin KJ, Riddell RH, Weinstein WM. Gastrointestinal pathology and its clinical implications. *Tokyo Igaku Shoin* 1992
- 62 Gillett HR, Freeman HJ. Serological testing for screening in adult celiac disease. *Can J Gastroenterol* 1999;13:265-269
- 63 Weinstein WM. Mucosal biopsy techniques and interaction with the pathologist. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2000;10:555-572
- 64 McGannon E. Gastric and duodenal polyps in familial adenomatous polyposis: a prospective study of the nature and prevalence of upper gastrointestinal polyps. *Gut* 1987;28:306-314
- 65 Offerhaus GJ, Giardiello FM, Krush AJ, Booker SV, Tersmette AC, Kelley NC. The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 1992;102:1980-1982
- 66 Burt RW, Bishop DT, Cannon-Albright L, Samowitz WS, Lee RL, DiSario JA. Population genetics of colonic cancer. *Cancer* 1992;70(Suppl):1719-1722
- 67 Jagelman DG, DeCosse JJ, Bussey HJR. Upper gastrointestinal cancer in patients with Gardner syndrome. *Lancet* 1988;2:1149-1150

- 68 Beckwith PS, van Heerden JA, Dozois RR. Prognosis of symptomatic duodenal adenomas in familial adenomatous polyposis. *Arch Surg* 1991;126:825-828
- 69 Iida M, Matsui T, Itoh H, Mibu R, Fujishima M. The value of pushtype jejunal endoscopy in familial adenomatosis coli/Gardner's syndrome. *Am J Gastroenterol* 1990;85:1346-1348
- 70 Kotzampassi K, Eleftheriadis E, Zissiadis A, Aletras H. Duodenal polyposis in Gardner's syndrome: the significance of endoscopic surveillance. *Am J Gastroenterol* 1990;85:1541-1542
- 71 ASGE. The role of endoscopy in the surveillance of premalignant conditions of the upper gastrointestinal tract. *Gastrointest Endosc* 1998;48:663-668
- 72 Nugent KP, Spigelman AD, Williams CB, Phillips RK. Iatrogenic pancreatitis in familial adenomatous polyposis. *Gut* 1993;34:1269-1270
- 73 Norton ID, Geller A, Petersen BT, Sorbi D, Gostout CJ. Endoscopic surveillance and ablative therapy for periampullary adenomas. *Am J Gastroenterol* 2001;96:101-106
- 74 ASGE. The role of colonoscopy in the management of patients with inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc* 1998;48:689-690
- 75 ASGE. The role of colonoscopy in management of patients with colonic neoplasia. *Gastrointest Endosc* 1999;50:921-924
- 76 Fleischer DE, Goldberg SB, Browning TH, Cooper JN, Friedman E, Goldner FH. Detection and surveillance of colorectal cancer. *JAMA* 1989;261:580-585
- 77 Jass JR. Hyperplastic polyps of the colorectum: innocent or guilty? *Dis Colon Rectum* 2001;44:163-166
- 78 Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *N Engl J Med* 2000;343:169-174
- 79 Nostrant TT, Kumar NB, Appelman HD. Histopathology differentiates acute self-limited colitis from ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1987;92:318-328
- 80 Surawicz CM, Belic L. Rectal biopsy helps to distinguish acute self-limited colitis from idiopathic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984;86:104-113
- 81 Coremans G, Rutgeerts P, Geboes K, Van den Oord J, Ponette E, Vantrappen G. The value of ileoscopy with biopsy in the diagnosis of intestinal Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 1984;30:167-172
- 82 Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults. American college of gastroenterology, Practice parameters committee. *Am J Gastroenterol* 1997;92:204-211
- 83 Friedman S, Rubin PH, Bodian C, Goldstein E, Harpaz N, Present DH. Screening and surveillance colonoscopy in chronic Crohn's colitis. *Gastroenterology* 2001;120:820-826
- 84 Riddell RH. Pathology of idiopathic inflammatory bowel disease. In: Kirsner JB, Shorter RG, editors. *Inflammatory bowel disease*. 3rd ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1988.p:329-350
- 85 Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC. Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 1983;14:931-968
- 86 Bernstein CN, Riddell RH. Colonoscopy plus biopsy in the inflammatory bowel diseases. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2000;10:755-774
- 87 Engelsingjerd M, Torres C, Odze RD. Adenoma-like polypoid dysplasia in chronic ulcerative colitis: A follow up study of 23 cases. *Gastroenterology* 1999;117:1288-1294
- 88 Rubin PH, Friedman S, Harpaz N, Goldstein E, Weiser J, Schiller J. Colonoscopic polypectomy in chronic colitis: conservative management after endoscopic resection of dysplastic polyps. *Gastroenterology* 1999;117:1295-300
- 89 Salt WB, Llaneza PP. Collagenous colitis: a cause of chronic diarrhea diagnosed only by biopsy of normal appearing colonic mucosa. *Gastrointest Endosc* 1986;32:421-423
- 90 Tanaka M, Mazzoleni G, Riddell RH. Distribution of collagenous colitis: utility of flexible sigmoidoscopy. *Gut* 1992;33:65-70
- 91 Elliott PR, Williams CB, Lennard-Jones JE, Dawson AM, Bartram CI, Thomas BM. Colonoscopic diagnosis of minimal change colitis in patients with a normal sigmoidoscopy and normal air-contrast barium enema. *Lancet* 1982;1:650-651

蔡振寨, 刘枫 译, 李兆申 审校, 200433, 上海市, 第二军医大学附属长海医院消化内科

内镜在食管癌中的治疗作用与评价

American Society of Gastrointestinal Endoscopy

编者按 该指南是消化内镜在常见临床情况下应用的系列讨论之一. 由美国消化内镜学会(ASGE)提供. 在撰写这一指南的过程中, 除MEDLINE检索到的相关文献外, 还参考了一些专家推荐的文章. 内镜的合理应用指南基于目前的一些重要的综述和专家共识. 还需要大量临床对照研究加以确定和必要的修订. 当临床实际情况与指南有所差异时影视当调整应适当调整.

王东, 江学良, 李兆申. 内镜在食管癌中的治疗作用与评价. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2722-2726

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2722.asp>

0 引言

在美国, 每年大约有 13 000 个患者被诊断为食管癌^[1], 并且食管腺癌是恶性肿瘤中发生率升高最快的^[2]. 食管癌可在内镜普查高风险疾病如 Barrett's 食管时被发现^[3], 而大部分新近诊断为食管癌的患者都有一定的症状, 并未经过普查^[4]. 该指南旨在为食管癌的内镜诊断、分期和治疗提供最新、实用的原则.

1 诊断

1.1 内镜诊断 标准上消化道内镜检查术是直视食管肿瘤和活检的首选方法. 如果标准内镜不能通过恶性肿瘤高度狭窄处, 可用超细内镜, 其插入部直径仅为 5.3-6 mm^[5], 有 75% 的病例可通过狭窄段^[6], 并完成食管、胃的检查. 色素内镜通过喷洒卢戈氏碘液^[7-8]或美蓝^[9-10]使病变部位更明显, 易于观察, 而普通内镜却很难观察到.

1.2 活检和组织学检查 诊断性内镜检查应对疑似的病变部位进行活检. 通过标准活检发现食管或食管胃交界处癌的敏感率为 66-96%^[11-13]. 尽管 1 块活检即可, 但达到最好效果则需要 7-10 块活检组织^[14]. 大号活检钳能取到大块病变组织, 但并不能说明这样更有诊断意义^[15]. 另外, 细胞刷活检组织学检查能提高诊断价值, 因此建议狭窄严重的恶性病变进行刷检^[16]. 如果某处是临床高度怀疑的病变而未行活检和/或刷检, 那么超声内镜检查和/或无引导细针穿刺检查能够确诊^[17].

1.3 超声内镜分期 可根据美国癌症联合会和美国抗癌协会制定的 TNM 系统对食管腺癌和鳞状细胞癌进行分期(表 1)^[18-19]. 癌症的准确分期对疾病的预后和制定治疗计划具有重要意义, 并能减少医疗费用^[20-22]. 超声内镜对 T 分期准确率为 85%, 对 N 分期准确率为 75-80%,

比 CT 检查的准确率高^[23]. 超声内镜对 T3 和 T4 肿瘤分期比对 T1 和 T2 肿瘤分期更加准确. 运用高频(15-30 MHz)超声探头对小 T1 和 T2 肿瘤进行分期能将准确率 83% 提高到 92%^[24-27]. 超声内镜检查淋巴结时, 能发现恶性肿瘤的淋巴结浸润, 表现为边缘尖锐、圆形、大小超过 1 cm^[28-29]. 尽管这些个体的结果是可预知的, 如果同时具有这四种表现则诊断的准确率超过 80%^[28-30], 这种情况仅发生于少数病例. 对淋巴结进行细针穿刺提高了超声内镜对 N 期判断的准确率^[31-32]. 为取得最大敏感性, 至少要进行 3 次细针穿刺^[33].

表 1 食管癌 TMN 分类及分期标准

T: 原发肿瘤

- Tx 原发肿瘤不能确定
- T0 无原发肿瘤证据
- Tis 原位癌
- T1 肿瘤只侵及黏膜固有层或黏膜下层, 未及肌层
- T2 肿瘤侵及肌层
- T3 肿瘤侵及食管周围组织, 未及邻近器官
- T4 肿瘤侵及邻近器官

N: 区域淋巴结

- Nx 区域淋巴结不能确定
- N0 无区域淋巴结转移
- N1 区域淋巴结转移

M: 远处转移

- Mx 远处转移不能确定
- M0 无远处转移
- M1a 颈部或腹腔淋巴结转移
- M1b 其他远处转移

超声内镜可能对食管狭窄的诊断意义不大. 有 29% 食管狭窄的患者内镜不能通过^[34], 提示为进展 T 期病变^[35]. 内镜无法通过狭窄大大降低了 T 和 N 期诊断的准确率^[35-36]. 如果可能, 利用超声探头或 7.5 MHz 线控食管探头通过狭窄处并进行 T 和 N 分期^[25, 37-38]. 相比较而言, 食管狭窄经扩张后, 标准超声内镜可以通过. 这个过程有 0-24% 穿孔的危险性, 但在大部分患者中超声内镜都可以通过^[31, 35-36, 39-41].

化疗和放疗后所致炎症和纤维化使超声内镜不能准确的进行术后分期^[42-44]. 判定治疗后效果理想的方法是在放化疗后测量肿瘤的最大横截面^[43, 45]. 肿瘤最大横

截面减少50%以上表示肿瘤病理学上(经切除后证实)和临床疗效上的改善^[45-46]。

1.4 监测复发情况 当每个行食管癌切除术的患者有局部复发时应进行内镜检查,以作为病情的部分评价。如此,标准内镜能对40%患者的复发进行诊断^[47]。然而,肿瘤的复发经常发生在黏膜下,所以内镜检查时容易漏诊。超声内镜对癌症的阳性诊断率为75-100%^[47-48]。尽管超声内镜在肿瘤切除后能探查到复发,但对生存率是否有影响还未证实^[48]。

2 治疗

手术切除适用于所有能手术治愈的患者(T1N0或T2N0)。局部有进展性病变(T3或N1)的患者应在手术切除后进行放化疗^[49]。尽管食管腺癌不如食管鳞状细胞癌对放化疗敏感,但食管腺癌患者以术前多种治疗,其生存结果大提高^[50-51]。不幸的是,食管癌发展为进展期病变时才表现为吞咽困难,此时5a生存率不超过20%^[1]。

姑息治疗能改善大部分患者的吞咽困难,减轻疼痛,支持营养。目前几乎还没有随机对照试验或比较治疗的研究来评价最好的姑息疗法,因此,最佳的选择是以肿瘤的特征,患者的意向以及专家的意见为参考。

2.1 探条扩张术 对恶性狭窄可在或不在X线监视下,用经内镜气囊或经导丝引导的聚乙烯探条进行扩张。尽管大部分患者经扩张后标准前视内镜可以通过肿瘤狭窄段,但临床效果是短暂而不持久^[52]。因为Maloney盲法扩张术的穿孔率较高,对复杂的食管狭窄我们不建议应用此法^[53]。

2.2 放置支架 放置自膨式金属支架能够保持足够的管腔并减轻吞咽困难的症状,这已成为姑息疗法的主流^[54]。最初所使用的塑料支架在置入时有6-8%急性并发症发生,特别是食管穿孔。自膨式金属支架,替代了塑料支架,可在内镜和透视监控下将其置入事先定好的位置。这种装置减少扩张需要,甚至完全代替了扩张。一旦通过肿瘤狭窄段,支架推送器便释放支架,于是支架自动展开。熟练的操作者放置支架的成功率大于90%^[56]。尽管金属支架比塑料支架贵得多,但使用金属支架能大大减少急性并发症和死亡率^[55]。

食管金属支架置入后期并发症的发生率达20-40%。包括胸痛、支架移位、出血及瘘口^[57]。先前曾行放疗和化疗的患者出现严重并发症的危险更高^[58,59]。

放置食管上段和最远段的食管支架有很大困难。支架放置后可能导致异物感和呼吸不畅。若支架放置于食管胃交界处,则可产生难以处理的反流症状,并容易移位,产生溃疡和食物贮留。新近出现的一种不同于其他的Z型支架,在远端有类似风向袋的瓣膜能够有效地减轻严重的反流症状^[60]。对于需将支架置于贲门以上的患者,需要使用质子泵抑制剂进行抑酸,并保持直立或半直立姿势,包括将床头抬高大约30度。另外,放置支架的患者应调整生活规律,包括避免硬质和纤维

食物,注意食用液体和较软的食物,并且要求在直立时用餐。

食管气管瘘是食管癌非常严重的并发症,可导致呼吸困难。使用带膜支架进行治疗可封闭70-100%患者的瘘口^[61]。

2.3 电凝术和激光治疗术 热灼技术通常是对较短,外部生长的阻塞性肿瘤的姑息疗法。这些特征显示了临床疗效,包括单极和双极电凝术^[62],氩离子凝固术^[63],Nd:YAG激光治疗术^[64]。尽管价格便宜,但由于单极和双极电凝术不易控制而受到一定的限制^[62]。氩离子凝固术是一种非接触性治疗法,其原理是氩离子气化后产生电凝效应。然而,这种消融法用来治疗巨大阻塞性肿瘤太表浅而不能持续太久^[63]。高剂量的Nd:YAG激光能造成组织穿孔并能减轻巨大食管肿瘤。在内镜控制下,激光能使肿瘤组织凝固和气化。但激光较昂贵并需要较高技术支持^[64]。

2.4 化学烧灼术 化学消融可使用无水酒精,经济并易操作。此法是用硬化注射针将无水酒精等注射入食管癌处,与进行食管静脉曲张出血止血一样。组织坏死后能短暂减轻吞咽困难。所使用剂量还没有一定的标准,并且将硬化剂只注射入病变组织是比较困难的。术后常出现胸痛,缓解是短暂的,需要重复内镜检查^[65]。

2.5 光学治疗 光学疗法是将光敏药物-卟菲尔钠(porphimer sodium)注射并集中于肿瘤组织。在内镜引导下低剂量激光使肿瘤暴露于红外线下。光束能在敏感组织处产生光化学反应,产生具有细胞毒性的单氧原子,继而肿瘤坏死。红外线可造成很大的组织穿孔^[66]。光动力学疗法在技术上容易操作,由于选择性破坏的肿瘤组织,可以用来治疗几乎管腔完全阻塞的食管癌。光学疗法可以在化疗和放疗前或后使用。此法常用来限制肿瘤生长,防止以前放置过食管支架的患者再次狭窄^[67-68]。光动力学疗法的限制因素是卟菲尔钠半衰期较长,多种治疗的费用较高。卟菲尔钠灌注后在皮肤里可保留6wk,患者需避免阳光暴晒,有严重晒伤的风险。其他光动力学疗法的并发症包括胸骨下痛,咽喉痛,发热,胸腔积液和食管气管瘘。

2.6 内镜下黏膜切除术(EMR) 很少患者能发现早期食管癌,然而Barrett's食管的普查却可早期发现。诊疗中心所进行的食管切除的死亡率高达3-5%,发病率为18-48%^[69-70]。对于仅位于黏膜层的高度或中度分化的腺癌,其直径小于2cm并且有特定内镜下形态,内镜下黏膜切除术可使发病率和死亡率降低。研究显示,97%的早期食管癌患者经内镜黏膜切除术可免于临床随访。但在平均12mo的随访中,有14%的复发率或出现的腺癌。在最近一次非随机的研究中,食管鳞状上皮癌患者EMR术后或手术后,其5a生存率分别为77.4%和84.5%^[72]。另外,在这项技术被常规推荐前,需要进行长期随访的对比研究。大部分研究应用超声胃镜(EUS)来筛选行EMR的患者^[71-73]。

2.7 对比治疗试验 一项随机试验发现, Nd:YAG 激光为主的热灼治疗术与自膨式金属支架的置入术相比, 并不具有明显优势^[74]. 经热灼治疗患者的生存中位数高于放置支架, 但两组对症状的减轻都不太理想. 两组都出现了与治疗有关的明显的并发症, 热灼治疗组的平均住院时间和总花费要明显高于另一组. 光动力学治疗与激光治疗对症状的缓解有相同的效果, 而光动力学治疗更易操作, 患者更易耐受. 酒精注射与 Nd:YAG 激光的疗效相同^[75]. 另外一些研究表明, 金属支架优于热灼治疗. 一个前瞻性随机研究对比了支架和 Nd:YAG 激光治疗, 结果显示支架置入技术的成功率和对吞咽困难的改善比 Nd:YAG 激光治疗有较大的优势^[76].

总之, 食管癌有较高的发生率和死亡率. 内镜在诊断和治疗食管癌中起关键作用. 对可疑病变要进行多次活检和刷检. 超声内镜优于 CT 扫描, 他能精确地对病变进行分期, 并根据分期指导治疗, 从而提高疗效、降低花费. 大部分患者并不能治愈而需要姑息治疗. 通过探条扩张、烧灼肿瘤或置入支架可对吞咽困难的患者进行内镜下姑息治疗. 探条扩张可使患者症状得到短期的缓解. 肿瘤烧灼可应用酒精注射、激光、光动力学疗法, 与其他治疗有相同的疗效. 自膨式金属支架效果好于塑料支架. 姑息治疗方案的选择取决于肿瘤的特性、患者的意向和专家的意见.

3 参考文献

- 1 Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics CA. *Cancer J Clin* 2002;52:23-47
- 2 Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology* 1993;104:510-513
- 3 Reid BJ, Weinstein WM, Lewin KJ, Haggitt RC, VanDeventer G, DenBesten L, Rubin CE. Endoscopic biopsy can detect high-grade dysplasia or early adenocarcinoma in Barrett's esophagus without grossly recognizable neoplastic lesions. *Gastroenterology* 1988;94:81-90
- 4 Dulai GS, Guha S, Kahn KL, Gornbein J, Weinstein WM. Preoperative prevalence of Barrett's esophagus in esophageal adenocarcinoma: a systematic review. *Gastroenterology* 2002;122:26-33
- 5 Nelson DB, Block KP, Bosco JJ, Burdick JS, Curtis WD, Faigel DO, Greenwald DA, Kelsey PB, Rajan E, Slivka A, Smith P, Wassef W, VanDam J, Wang KK. Technology status evaluation report: ultrathin endoscopes esophagogastroduodenoscopy: March 2000. *Gastrointest Endosc* 2000;51:786-789
- 6 Mulcahy HE, Fairclough PD. Ultrathin endoscopy and difficult duodenal intubation. *Gastrointest Endosc* 1998;48:115
- 7 Sugimachi K, Kitamura K, Baba K, Ikebe M, Kuwano H. Endoscopic diagnosis of early carcinoma of the esophagus using Lugol's solution. *Gastrointest Endosc* 1992;38:657-661
- 8 Inoue H, Rey JF, Lightdale C. Lugol chromoendoscopy for esophageal squamous cell cancer. *Endoscopy* 2001;33:75-79
- 9 Wo JM, Ray MB, Mayfield-Stokes S, Al-Sabbagh G, Gebrail F, Slone SP, Wilson MA. Comparison of methylene blue-directed biopsies and conventional biopsies in the detection of intestinal metaplasia and dysplasia in Barrett's esophagus: a preliminary study. *Gastrointest Endosc* 2001;54:294-301
- 10 Canto MI, Setrakian S, Willis J, Chak A, Petras R, Powe NR, Sivak MV Jr. Methylene blue-directed biopsies improve detection of intestinal metaplasia and dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2000;51:560-568
- 11 Graham DY, Schwartz JT, Cain GD, Gyorkey F. Prospective evaluation of biopsy number in the diagnosis of esophageal and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 1982;82:228-231
- 12 Zargar SA, Khuroo MS, Jan GM, Mahajan R, Shah P. Prospective comparison of the value of brushings before and after biopsy in the endoscopic diagnosis of gastroesophageal malignancy. *Acta Cytol* 1991;35:549-552
- 13 Winawer SJ, Sherlock P, Belladonna JA, Melamed M, Beattie EJ Jr. Endoscopic brush cytology in esophageal cancer. *JAMA* 1975;232:1358
- 14 Dekker W, Tytgat GN. Diagnostic accuracy of fiberendoscopy in the detection of upper intestinal malignancy. A follow-up analysis. *Gastroenterology* 1977;73(4 Pt 1):710-714
- 15 Falk GW, Rice TW, Goldblum JR, Richter JE. Jumbo biopsy forceps protocol still misses unsuspected cancer in Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Gastrointest Endosc* 1999;49:170-176
- 16 Kobayashi S, Kasugai T. Brushing cytology for the diagnosis of gastric cancer involving the cardia or the lower esophagus. *Acta Cytol* 1978;22:155-157
- 17 Faigel DO, Deveney C, Phillips D, Fennerty MB. Biopsy-negative malignant esophageal stricture: diagnosis by endoscopic ultrasound. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2257-2260
- 18 Sobin L, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours. 6th ed. UICC. New York: John Wiley and Sons, 2002
- 19 Fleming ID, Cooper JS, Henson DE. AJCC Cancer Staging Handbook. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998
- 20 Mallery S, VanDam J. EUS in the evaluation of esophageal carcinoma. *Gastrointest Endosc* 2000;52:s6-s11
- 21 Hiele M, De Leyn PD, Shurmans P. Relation between endoscopic ultrasound findings and outcome of patients with tumours of the esophagus or esophagogastric junction. *Gastrointest Endosc* 1997;45:381-386
- 22 Shumaker DA, de Garmo P, Faigel DO. Potential impact of preoperative EUS on esophageal cancer management and cost. *Gastrointest Endosc* 2002;56:391-396
- 23 Rosch T. Endosonographic staging of gastric cancer: a review of literature results. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1995;5:549-557
- 24 Rosch T, Classen M. Staging Esophageal cancer: The Munch Experience. In: Van Dam J, Sivak M, eds. Gastrointestinal Endosonography. Philadelphia: WB Saunders Co., 1999
- 25 Menzel J, Nottberg H, Hoepffner N, Senninger N, Domschke W. Preoperative staging of stenosing esophageal carcinoma: prospective comparison of mini-endosonography with conventional endosonography. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998;115:1354-1356
- 26 Hasegawa N, Niwa Y, Arisawa T, Hase S, Goto H, Hayakawa T. Preoperative staging of superficial esophageal carcinoma: comparison of an ultrasound probe and standard endoscopic ultrasonography. *Gastrointest Endosc* 1996;44:388-393
- 27 Murata Y, Suzuki S, Ohata M. Small ultrasonic probes for determination of the depth of superficial esophageal cancer. *Gastrointest Endosc* 1994;40:442-446
- 28 Catalano MF, Sivak MV Jr, Rice T, Gragg LA, Van Dam J. Endosonographic features predictive of lymph node metastasis. *Gastrointest Endosc* 1994;40:442-446
- 29 Faigel D. EUS in patients with benign and malignant lymphadenopathy. *Gastrointest Endosc* 2001;53:593-598
- 30 Bhutani MS, Hawes RH, Hoffman BJ. A comparison of the accuracy of echo features during endoscopic ultrasound (EUS) and EUS-guided fine-needle aspiration for diagnosis of malignant lymph node invasion. *Gastrointest Endosc* 1997;45:474-479
- 31 Eloubeidi MA, Wallace MB, Reed CE, Hadzijahic N, Lewin DN, Van Velse A, Leveen MB, Etemad B, Matsuda K, Patel RS, Hawes RH, Hoffman BJ. The utility of EUS and EUS-guided fine needle aspiration in detecting celiac lymph node metastasis in patients with esophageal cancer: a single-center experience. *Gastrointest Endosc* 2001;54:714-719

- 32 Vazquez-Sequeiros E, Norton ID, Clain JE, Wang KK, Affi A, Allen M, Deschamps C, Miller D, Salomao D, Wiersema MJ. Impact of EUS-guided fine-needle aspiration on lymph node staging in patients with esophageal carcinoma. *Gastrointest Endosc* 2001;53:751-757
- 33 Wallace MB, Kennedy T, Durkalski V, Eloubeidi MA, Etamad R, Matsuda K, Lewin D, Van Velse A, Hennesey W, Hawes RH, Hoffman BJ. Randomized controlled trial of EUS-guided fine needle aspiration techniques for the detection of malignant lymphadenopathy. *Gastrointest Endosc* 2001;54:441-447
- 34 Mallery S, Van Dam J. Increased rate of complete EUS staging of patients with esophageal cancer using the nonoptical, wire-guided echoendoscope. *Gastrointest Endosc* 1999;50:53-57
- 35 Mallery S, Van Dam J. Increased rate of complete EUS staging of patients with esophageal cancer using the nonoptical, wire-guided echoendoscope. *Gastrointest Endosc* 1999;50:53-57
- 36 Catalano MF, Van Dam J, Sivak MV Jr. Malignant esophageal strictures: staging accuracy of endoscopic ultrasonography. *Gastrointest Endosc* 1995;41:535-539
- 37 Fockens P, Van Dulleman H. Endosonography of stenotic esophageal carcinomas: preliminary experience with an ultrathin, balloon-fitted ultrasound probe on four patients. *Gastrointest Endosc* 1994;40:226-228
- 38 Chak A, Canto M, Stevens PD, Lightdale CJ, Van de Mierop F, Cooper G, Pollack BJ, Sivak MV Jr. Clinical applications of a new through-the-scope ultrasound probe: prospective comparison with an ultrasound endoscope. *Gastrointest Endosc* 1997;45:291-295
- 39 Kallimanis GE, Gupta PK, al-Kawas FH, Tio LT, Benjamin SB, Bertagnolli ME, Nguyen CC, Gomes MN, Fleischer DE. Endoscopic ultrasound for staging esophageal cancer, with or without dilation, is clinically important and safe. *Gastrointest Endosc* 1995;41:540-546
- 40 Wallace MB, Hawes RH, Sahai AV, Van Velse A, Hoffman BJ. Dilation of malignant esophageal stenosis to allow EUS guided fine-needle aspiration: safety and effect on patient management. *Gastrointest Endosc* 2000;51:309-313
- 41 Pfau PR, Ginsberg GG, Lew RJ, Faigel DO, Smith DB, Kochman ML. Esophageal dilation for endosonographic evaluation of malignant esophageal strictures is safe and effective. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2813-2815
- 42 Laterza E, de Manzoni G, Guglielmi A, Rodella L, Tedesco P, Cordiano C. Endoscopic ultrasonography in the staging of esophageal carcinoma after preoperative radiotherapy and chemotherapy. *Ann Thorac Surg* 1999;67:1466-1469
- 43 Isenberg G, Chak A, Canto MI, Levitan N, Clayman J, Pollack BJ, Sivak MV Jr. Endoscopic ultrasound in restaging of esophageal cancer after neoadjuvant chemoradiation. *Gastrointest Endosc* 1998;48:158-163
- 44 Zuccaro G Jr, Rice TW, Goldblum J, Medendorp SV, Becker M, Pimentel R, Gitlin L, Adelstein DJ. Endoscopic ultrasound cannot determine suitability for esophagectomy after aggressive chemoradiotherapy for esophageal cancer. *Am J Gastroenterol* 1999;94:906-912
- 45 Zuccaro G Jr, Rice TW, Goldblum J, Medendorp SV, Becker M, Pimentel R, Gitlin L, Adelstein DJ. Endoscopic ultrasound cannot determine suitability for esophagectomy after aggressive chemoradiotherapy for esophageal cancer. *Am J Gastroenterol* 1999;94:906-912
- 46 Chak A, Canto MI, Cooper GS, Isenberg G, Willis J, Levitan N, Clayman J, Forastiere A, Heath E, Sivak MV Jr. Endosonographic assessment of multimodality therapy predicts survival of esophageal carcinoma patients. *Cancer* 2000;88:1788-1795
- 47 Catalano MF, Sivak MV Jr, Rice TW, Van Dam J. Postoperative screening for anastomotic recurrence of esophageal carcinoma by endoscopic ultrasonography. *Gastrointest Endosc* 1995;42:540-544
- 48 Fockens P, Manshanden CG, van Lanschot JJ, Obertop H, Tytgat GN. Prospective study on the value of a comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1996;335:462-467
- 49 Lightdale CJ. Esophageal cancer. American college of gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1999;94:20-29
- 50 Walsh TN, Noonan N, Hollywood D, Kelly A, Keeling N, Hennessy TP. A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1996;335:462-467
- 51 Bossett J, Gignoux M, Triboulet J. Chemoradiotherapy followed by surgery compared with surgery alone in squamous-cell cancer of the esophagus. *N Engl J Med* 1997;337:161-167
- 52 Adler DG, Pearson RK, Baron TH. Endoscopic drainage of a pancreatic pseudocyst in a symptomatic patient with subtotal gastrectomy and Roux-en-Y anastomosis. *Gastrointest Endosc* 2003;57:787-790
- 53 Hernandez LV, Jacobson JW, Harris MS, Hernandez LJ. Comparison among the perforation rates of Maloney, balloon, and suture dilation of esophageal strictures. *Gastrointest Endosc* 2000;51(4 Pt 1):460-462
- 54 Baron TH. Expandable metal stents for the treatment of cancerous obstruction of the gastrointestinal tract. *N Engl J Med* 2001;344:1681-1687
- 55 Knyrim L, Wagner H, Bethge N, Leymeling M, Vakil N. A controlled trial of an expansile stent for palliation of esophageal obstruction due to inoperable cancer. *N Engl J Med* 1993;329:302-307
- 56 Siersema PD, Schrauwen SL, van Blankenstein M, Steyerberg EW, van der Gaast A, Tilanus HW, Dees J. Rotterdam esophageal tumor study group. Self-expanding metal stents for complicated and recurrent esophagogastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2001;54:579-586
- 57 Ramirez FC, Dennert B, Zierer ST, Sanowski RA. Esophageal self-expandable metallic stents: indications, practice, techniques, and complications: results of a national survey. *Gastrointest Endosc* 1997;45:360-364
- 58 Kinsman KJ, DeGregorio BT, Katon RM, Morrison K, Saxon RR, Keller FS, Rosch J. Prior radiation and chemotherapy increase the risk of life-threatening complications after insertion of metallic stents for esophagogastric malignancy. *Gastrointest Endosc* 1996;43:196-203
- 59 Bethge N, Sommer A, Vakil N. Palliation of malignant esophageal obstruction due to intrinsic and extrinsic lesions with expandable metal stents. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1829-1832
- 60 Dua KS, Kozarek R, Kim J, Evans J, Medda BK, Lang I, Hogan WJ, Shaker R. Self-expanding metal esophageal stent with anti-reflux mechanism. *Gastrointest Endosc* 2001;53:603-613
- 61 Johnston JH, Fleischer D, Petrini J, Nord HJ. Palliative bipolar electrocoagulation therapy of obstructing esophageal cancer. *Gastrointest Endosc* 1987;33:349-353
- 62 Heindorff H, Wojdemann M, Bisgaard T, Svendsen LB. Endoscopic palliation of inoperable cancer of the esophagus or cardia by argon electrocoagulation. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:21-23
- 63 Heindorff H, Wojdemann M, Bisgaard T, Svendsen LB. Endoscopic palliation of inoperable cancer of the esophagus or cardia by argon electrocoagulation. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:21-23
- 64 Lightdale CJ, Zimbalist E, Winawer SJ. Outpatient management of esophageal cancer with endoscopic Nd: YAG laser. *Am J Gastroenterol* 1987;82:46-50
- 65 Payne-James J, Spiller R, Misiewicz J, Silk D. Use of ethanol-induced tumor necrosis to palliate dysphagia in patients with esophagogastric cancer. *Gastrointest Endosc* 1990;36:43-46
- 66 Heier SK, Rothman KA, Heier LM, Rosenthal WS. Photodynamic therapy for obstructing esophageal cancer: light dosimetry and randomized comparison with Nd: YAG laser therapy. *Gastroenterology* 1995;109:63-72
- 67 Raijman I, Lalor E, Marcon NE. Photodynamic therapy for tumor ingrowth through an expandable esophageal stent. *Gastrointest Endosc* 1995;41:73-74
- 68 Lightdale CJ, Heier SK, Marcon NE, McCaughan JS Jr, Gerdes

- H, Overholt BF, Sivak MV Jr, Stiegmann GV, Nava HR. Photodynamic therapy with porfimer sodium versus thermal ablation therapy with Nd: YAG laser for palliation of esophageal cancer: a multicenter randomized trial. *Gastrointest Endosc* 1995;42:507-512
- 69 Holscher A, Bollschweiler E, Schroder W, Gutschow C, Siewert J. Prognostic differences between early squamous cell and adenocarcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 1997;10: 179-184
- 70 Heitmiller RF, Redmond M, Hamilton SR. Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. An indication for prophylactic esophagectomy. *Ann Surg* 1996;224:66-71
- 71 Ell C, May A, Gossner L, Pech O, Gunter E, Mayer G, Henrich R, Vieth M, Muller H, Seitz G, Stolte M. Endoscopic mucosal resection of early cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2000;118:670-677
- 72 Shimizu Y, Tsukagoshi H, Fujita M, Hosokawa M, Kato M, Asaka M. Long-term outcome after endoscopic mucosal resection in patients with esophageal squamous cell carcinoma invading the muscularis mucosae or deeper. *Gastrointest Endosc* 2002;56:387-390
- 73 Nijhawan PK, Wang KK. Endoscopic mucosal resection for lesions with endoscopic features suggestive of malignancy and high-grade dysplasia within Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2000;52:328-332
- 74 Dallal HJ, Smith GD, Grieve DC, Ghosh S, Penman ID, Palmer KR. A randomized trial of thermal ablative therapy versus expandable metal stents in the palliative treatment of patients with esophageal carcinoma. *Gastrointest Endosc* 2001; 54:549-557
- 75 Carazzone A, Bonavina L, Segalin A, Ceriani C, Peracchia A. Endoscopic palliation of oesophageal cancer: results of a prospective comparison of Nd:YAG laser and ethanol injection. *Eur J Surg* 1999;165:351-356
- 76 Adam A, Ellul J, Watkinson AF, Tan BS, Morgan RA, Saunders MP, Mason RC. Palliation of inoperable esophageal carcinoma: a prospective randomized trial of laser therapy and stent placement. *Radiology* 1997;202:344-348

王东 译, 江学良, 李兆申 审校, 200433, 上海市, 第二军医大学附属长海医院消化内科

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

科技论文产出排座次中国论文总数位居世界第五临床 医学类在国内名列前茅

健康报报道(记者张荔子) 12月7日, 2003年度中国科技论文统计结果显示, 我国科技论文占世界论文总数的5.1%, 继续处于美、日、英、德之后, 位列世界第五。其中, 临床医学67312篇, 在国内无论是论文数, 还是被引用次数都是最多的学科。

据介绍, 2003年度三种国际上具有影响的检索工具《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP)收录含有“中华人民共和国”的论文共93352篇, 比2002年增加15957篇, 增长率为20.6%。尤其是SCI论文数比上一年增长22.2%, 被引用篇数和次数分别增长了29%和39.3%, 表明我国论文影响力指标较数量增长得更快。

从SCI收录的论文可以看出, 2003年国际合作论文约占我国发表论文总数的23.6%, 比上年度增加2.2个百分点。涉及国家和作者最多的是在《英国癌症杂志》上发表的“关于酗酒、吸烟与肺癌的分析研究”一文, 共有30个国家和地区75个机构, 220位作者参与研究。

分类统计还排列出高等院校、科研、医疗等各类机构论文产出和被引用情况前20位。解放军总医院连续4年获全国医疗机构国内科技论文被引用数量第一名, 第四军医大学西京医院连续4年获全国医疗机构国内科技论文数量第一, 北京大学第一医院名列SCI收录论文第一(有关排名详见三版)。我国发表在国际高影响期刊、累积被引用次数最多的前10篇论文的第一作者有3位来自医院, 他们是阜外心血管病医院刘力生、中南大学湘雅医院夏家辉和上海第二医科大学瑞金医院牛超。

共有425种医药卫生类期刊进入2003年影响因子分类排序, 影响因子超过1的期刊有22种, 较2002年增加10种。值得一提的是, 在9种护理学类期刊中就有3种影响因子超过1。《世界华人消化杂志》影响因子2.924, 依然高居我国科技期刊首位。(2004-12-08)

结肠镜诊疗的并发症

American Society of Gastrointestinal Endoscopy

编者按 结肠镜诊疗的并发症是消化内镜在常见临床情况下应用的系列讨论之一,由美国消化内镜学会提供.在撰写这一指南的过程中,除MEDLINE检索到的文章外,还参考一些专家推荐的文章.内镜的合理应用指南基于目前的一些重要综述和专家共识,还需要大量的临床对照研究加以确定和必要的修订.临床上实际情况和指南有所差异时应适当调整.

张文俊, 江学良, 李兆申. 结肠镜诊疗的并发症. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2727-2730

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2727.asp>

0 引言

结肠镜诊疗的并发症较少见,但可能是严重且致命的.一组超过25 000例诊断性结肠镜的研究报告总的并发症(主要是出血和穿孔)发生率为0.35%^[1],与最近3 196例前瞻性研究报告的0.3%相似^[2].结肠镜下息肉摘除并发症发生率升高到2.3%^[1],但少于开腹结肠切除和息肉摘除并发症的发生率,后者发生率为14-20%^[3-4],并有5%的死亡率^[3].社区医疗单位肠镜并发症发生率则难以确定,因为并发症发生率的报告主要来自有经验的中心.另外,随着设备、电子手术技术和诊疗经验的提高,结肠镜检查 and 息肉摘除的并发症发生率降低^[5].无症状人群结肠镜筛查并发症发生率为0.2-0.3%,包括出血、穿孔、心肌梗死和脑血管意外^[6-7].随着大量的多中心数据的引入如临床后果研究启动(CORI)计划,在将来能更好地用于并发症的评估.然而,尽管能更准确地获取操作后立即出现的并发症的数据,因为没有报道,迟发性并发症仍然被低估.肠镜下息肉摘除的方法有以下几种,冷活检、热活检(如用烧灼术活检)和有或没有电活检的圈套活检.氩离子凝固也用于将大的无蒂息肉分块摘除^[8-9].息肉摘除的并发症同样包括诊断性结肠镜的并发症.另外,与息肉摘除直接相关的并发症有急性或迟发性出血、息肉摘除部位的穿孔和息肉摘除术后凝固综合征.与镇静剂相关的并发症已在上消化道内镜指南中述及^[10].

1 并发症的危险因素

既往肠镜检查 and 体格检查表明检查前用药和凝血机制异常会增加出血的危险性.尽管一组4 735例息肉摘除用纯切电流和凝固或混合电流发生的出血相近,但一般认为用纯切电流可能会增加出血的危险^[11-12].随着内镜医

师经验的增加,息肉摘除术后出血发生率会降低^[13].息肉的大小与穿孔发生的关系还不清楚^[14],然而,认为右侧无蒂息肉穿孔发生率最高,因为这些区域结肠壁最薄^[15].

2 并发症的预防

尽管做了最大的努力,在结肠镜检查或息肉摘除时总有发生并发症的危险,然而,一些措施可以使并发症的发生最少化.准确的收紧切除息肉的圈套需要有一定的经验.不适当的延迟关闭圈套器会导致息肉茎部干燥,从而使圈套器不能完全闭合.相反在关闭圈套器之前烧灼不够就容易引起出血.另外,要非常小心避免将正常黏膜收入圈套器^[16].用生理盐水或去甲肾上腺素注射到息肉基底或息肉下使息肉抬高,可增加息肉与黏膜下层分离的程度,已将这种方法作为一种降低息肉摘除术后出血危险的技术,尤其用于位于结肠右侧大的无蒂息肉的摘除,同时也降低了热损伤的深度^[17-20].也有用金属夹或可分离的圈套器等机械方法预防息肉切除相关的出血^[21-22].对于有凝血障碍的患者,要推迟检查或纠正凝血异常更为合适.因为这些并发症并不常见,因而也没有对照研究证明这些方法的优点.为减少出血,可考虑使用不用电烧灼的小圈套器替代热活检钳治疗小的息肉^[23].

3 肠道准备相关的并发症

结肠镜检查前清洁肠道是为了更好地观察结肠黏膜,另外,还可以降低肠腔内有潜在爆炸性气体的浓度.已报道的肠道内气体爆炸的并发症极少^[5,24].一组研究发现尽管只用标准的磷酸苏打灌肠行乙状结肠镜检查前的准备,有10%的患者肠腔内有可燃气体氢气和甲烷,而用聚乙二醇(PEG)行肠道准备的患者没有可燃气体^[25-26].其他研究发现用甘露醇行肠道准备有肠道气体爆炸的潜在危险^[27-30].常用的肠道准备有两种类型:含有聚乙二醇的平衡盐液和非聚乙二醇液如枸橼酸镁和磷酸盐(口服磷酸苏打).在老年人、肾功能不全或淤血性心衰的患者,两种准备方法都可能引起致命性水电解质紊乱.口服肠道准备的其他少见并发症有呕吐引起的贲门黏膜撕裂综合征(Mallory-Weiss tears)^[31-33]、食管穿孔^[34]和吸入性肺炎^[35]等.用磷酸盐行肠道准备可能引起炎症性肠病患者肠黏膜的内镜及组织学改变^[36].

4 穿孔

结肠镜操作过程中出现的结肠穿孔可能来自结肠镜对肠壁的机械损伤、气压伤或直接由于治疗所致。穿孔的早期症状有持续性腹痛和腹胀,后期症状主要由腹膜炎所致,包括发热和白细胞升高,胸腹平片发现膈下有游离气体。CT检查优于立位平片^[37],因此,对怀疑有穿孔,而胸腹平片检查又没有发现有游离气体的患者,应考虑腹部CT检查。诊断性和治疗性结肠镜穿孔发生率差别不大。一组25 000例结肠镜诊疗,诊断性结肠镜穿孔发生率为0.2%^[1],其中6 000例结肠息肉摘除穿孔发生率为0.32%。而另一组5 000例结肠镜诊治报告发现,诊断性结肠镜穿孔发生率为0.12%(4例),息肉摘除者穿孔发生率为0.11%(2例)^[38]。对1 172例患者的1 555个息肉摘除的回顾分析报告发现只有1例1 cm大小的有蒂息肉摘除后发生隐匿性穿孔^[16]。一组591例患者结肠镜下摘除息肉1 000个无穿孔发生^[39]。一组777例患者摘除息肉2 019个息肉,有2例发生穿孔(0.3%)^[40]。而另一组3 196例的结肠镜筛查前瞻性研究无穿孔发生^[2]。

5 出血

结肠镜诊治后出血归于下消化道出血范畴,其发生后可能需要输血、住院、重新行结肠镜检查或手术^[2]。出血可能在息肉摘除后很快发生,也有在术后29 d才出现^[41]。出血部位可以通过内镜检查或红细胞核素扫描确定^[42]。报告的息肉摘除术后出血的发生率为0.3–6.1%^[2, 11]。美国消化内镜协会(ASGE)的调查发现,25 000例诊断性结肠镜出血发生率为0.09%,6 000例息肉摘除者出血发生率为1.7%^[1]。一组1 795个息肉摘除后有48个息肉摘除处发生出血(2.7%)^[38]。一组报告0.64%的息肉摘除后发生出血(0.85%的患者)^[12],其中10例患者中有3例需要输血。另一系列591例患者行1 000个息肉摘除,有8例发生小的出血(1.4%)^[39]。其他研究者报道息肉摘除后立即出现出血者为1.5%,迟发出血为1.9%^[40]。尽管热活检、冷活检和圈套电烧灼的出血率有差别,但没有研究者证实这一观点。

6 息肉摘除术后凝固综合征

已有报道在息肉摘除的过程中,由于电凝固对肠壁的损伤,可引起0.51–1.2%的患者有跨膜烧伤,引起息肉摘除术后凝固综合征^[16, 40]。这一综合征一般发生在结肠镜后1–5 d,典型表现有发热、局限性腹痛、腹膜炎征候和白细胞增多,放射检查没有游离气体。6篇报道中有5篇报道的病例息肉位于结肠右侧壁,并均为无蒂息肉^[16]。识别这种情况非常重要,因为这一情况无需手术治疗。

7 其他并发症

结肠镜诊疗的其他少见并发症包括脾破裂^[41–43]、急性

阑尾炎^[44]、肠系膜血管撕裂引起的腹腔内出血。如果用于消毒的戊二醛没有清洗干净也会引起化学性结肠炎^[45]。结肠镜下息肉摘除的并发症还包括菌血症^[46]、腹膜后脓肿^[47]、皮下气肿^[48–49]、圈套器将正常肠黏膜套入^[16]。与结肠镜检查有关的死亡也有报道,已报道的83 725例操作有5例死亡(0.006%)^[50]。

8 并发症的治疗

所有单纯穿孔的患者均需考虑手术处理,尽管穿孔通常都需要手术修复,部分病例也可考虑非手术处理^[51],隐匿性穿孔或局限性腹膜炎没有脓肿形成的征兆,且保守治疗有效的患者可以避免手术^[52–53]。腹腔镜下穿孔修补也是可行的^[54]。所谓的微小穿孔是指发现比较早(息肉摘除后6–24 h),表现为局限性的腹痛和腹肌紧张,而没有弥漫性腹膜炎的刺激症状^[55]。这类患者的处理为肠道休息、静脉使用抗生素和观察临床表现有无恶化。尽管有报道将穿孔处用夹子闭合^[56],但这种方法目前还没有被推荐。

息肉摘除术后出血通常比较明显,可以通过结肠镜进行治疗。用于消化道出血的治疗方法,除标准的内镜治疗(如注射治疗、热凝固和电凝固)外,近来有套扎、环内结扎和止血夹等用于临床^[57–58]。非内镜下处理方法包括血管栓塞和手术^[59]。处理息肉摘除术后出血并非都需要进入重症监护病房。

息肉摘除术后凝固综合征通常用静脉内补液、使用广谱抗生素和禁食到症状消失等措施^[16],也有通过口服抗生素在门诊治疗获得成功的报道^[40]。

9 结肠镜染色

如果发现病灶后不准备立即经内镜摘除,或需要定位行内镜随访,用可以永久存在的染料(如印度墨水)在结肠病灶附近刺纹,从而使随后的外科手术或内镜随访容易定位。注射永久存在的天然墨水,也需要考虑操作的安全性。一组55例用印度墨水结肠刺纹的患者,平均36 mo后活检复查,发现6例患者结肠有轻度慢性炎症,1例有增生改变^[60]。一组7例患者行结肠刺纹标记后1 d到7 wk行手术治疗,发现组织学改变有结肠黏膜下和浆肌层组织坏死、水肿、中性粒细胞浸润等^[61]。结肠刺纹标记后也有发生伴有腹膜炎的结肠脓肿的报道^[62]。有关这一主题的综述报告结肠刺纹标记并发症发生率约为0.22%^[63]。动物实验中将印度墨水稀释(1:100)到内镜和腹腔镜可见的程度,在注射后7 d到1 mo行腹腔镜下手术,没有发现明显的组织学改变^[64]。最近报道对113例患者行188处注射一种新的碳基永久标记物,没有并发症发生^[65]。

10 结肠镜检查失败后钡剂灌肠造影的安全性

假如没有发生穿孔,患者已经做了充分准备,而结肠镜检查失败,可以考虑当日行钡剂灌肠造影检查^[66]。而

结肠镜下息肉摘除术后或结肠行深的活检(直肠除外)后5 d内行钡剂灌肠检查是不安全的^[67-68]。然而有关这一措施重要性的资料很少。另外, 结肠息肉摘除后立即行结肠CT成像(仿真肠镜)是否安全还不清楚。

总之, 结肠镜检查的并发症虽然少见, 但不可避免, 发生率一般在0.35%以下。因为有发生并发症的可能就要执行告知制度。操作并发症包括穿孔、出血、息肉摘除术后凝固综合征、感染、肠道准备相关的并发症和死亡, 治疗性结肠镜并发症发生率多于诊断性结肠镜检查。与结肠息肉摘除相关并发症的危险因素包括息肉的部位和大小、操作者的经验、息肉摘除的技术和使用的凝固电流的种类。大而无蒂息肉下注射盐水可以减少热损伤的深度, 从而降低了并发症的发生。并发症的早期识别和及时处理可以降低患者的死亡率。针对不同的并发症采用不同的治疗方法, 如息肉摘除术后凝固综合征宜采用支持治疗, 出血后可在肠镜下注射或电凝止血, 单纯穿孔可手术修补。术前正确评估危险因素, 及时识别潜在的并发症, 并采取合理的处理, 可以促进患者的痊愈。

11 参考文献

- Silvis SE, Nebel O, Rogers G, Sugawa C, Mandelstam P. Endoscopic complications: results of the 1974 American Society for Gastrointestinal Endoscopy survey. *JAMA* 1976;235:928-930
- Nelson DB, McQuaid KR, Bond JH, Lieberman DA, Weiss DG, Johnston TK. Procedural success and complications of large scale screening colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 2002; 55:307-314
- Johnson SM. Colonoscopy and polypectomy. *Am J Surg* 1978; 136:313-316
- Kleinfeld G, Gump F. Complications of colotomy and polypectomy. *Surg Gynecol Obstet* 1960;111:726-728
- Bigard M, Gaucher P, Lassalle C. Fatal colonic explosion during colonoscopic polypectomy. *Gastroenterology* 1979;77: 1307-1310
- Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, Ahnen DJ, Garewal H, Chejfec G. Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans affairs cooperative study group 380. *N Engl J Med* 2000;343:162-168
- Imperiale T, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *N Engl J Med* 2000;343:169-174
- Zlatanich J, Wayne J, Kim P, Baiocco P, Gleim G. Large sessile colonic adenomas: use of argon plasma coagulator to supplement piecemeal snare polypectomy. *Gastrointest Endosc* 1999; 49:731-735
- Brooker JC, Saunders BP, Shah SG, Thapar CJ, Suzuki N, Williams CB. Treatment with argon plasma coagulation reduces recurrence after piecemeal resection of large sessile colonic polyps: a randomized trial and recommendations. *Gastrointest Endosc* 2002;55:371-375
- Eisen GM, Baron TH, Dominitz JA, Faigel DO, Goldstein JL, Johanson JF. Complications of upper GI endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2002;55:784-793
- Rosen L, Bub D, Reed J, Nastasee S. Hemorrhage following colonoscopic polypectomy. *Dis Colon Rectum* 1993;36:1126-1131
- Parra-Blanco A, Kaminaga N, Kojima T, Endo Y, Tajiri A, Fujita R. Colonoscopic polypectomy with cutting current: is it safe? *Gastrointest Endosc* 2000;51:676-681
- Rogers B, Silvis S, Nebel O, Sugawa C, Mandelstam P. Complications of flexible fiberoptic colonoscopy and polypectomy. *Gastrointest Endosc* 1975;22:73-77
- Anderson M, Pasha T, Leighton J. Endoscopic perforation of the colon: lessons from a 10-year study. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3418-3422
- Wadas DD, Sanowski R. Complications of the hot biopsy forceps technique. *Gastrointest Endosc* 1988;34:32-37
- Nivatvongs S. Complications in colonoscopic polypectomy: an experience with 1555 polypectomies. *Dis Colon Rectum* 1986; 28:825-830
- Shirai M, Nakamura T, Matsuura A, Ito Y, Kobayashi S. Safer colonoscopic polypectomy with local submucosal injection of hypertonic saline-epinephrine solution. *Am J Gastroenterol* 1994;89:334-338
- Folwaczny C, Heldwein W, Obermaier G, Schindlbeck N. Influence of prophylactic local administration of epinephrine on bleeding complications after polypectomy. *Endoscopy* 1997; 29:31-33
- Norton ID, Wang L, Levine SA, Burgart LJ, Hofmeister EK, Rumalla A. Efficacy of colonic submucosal saline solution injection for the reduction of iatrogenic thermal injury. *Gastrointest Endosc* 2002;56:95-99
- Iishi H, Tatsuta M, Kitamura S, Narahara H, Iseki K, Ishiguro S. Endoscopic resection of large sessile colorectal polyps using a submucosal saline injection technique. *Hepatology* 1997;44:698-702
- Iida Y, Miura S, Munemoto Y, Kasahara Y, Asada Y, Toya D. Endoscopic resection of large colorectal polyps using a clipping method. *Dis Colon Rectum* 1994;37:179-180
- Iishi H, Tatsuta M, Narahara H, Iseki K, Sakai N. Endoscopic resection of large pedunculated colorectal polyps using a detachable snare. *Gastrointest Endosc* 1996;44:594-597
- Tappero G, Gaia E, De Guili P, Martin S, Gubetta L, Emanuelli G. Cold-snare excision of small colorectal polyps. *Gastrointest Endosc* 1992;38:310-313
- Bisson B. Methane gas explosion during colonoscopy. *Gastroenterol Nurs* 1997;20:136-137
- Monahan D, Peluso F, Goldner F. Combustible colonic gas levels during flexible sigmoidoscopy and colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 1992;38:40-43
- Avgerinos A, Kalantzis N, Rekoumis G, Pallikaris G, Arapakis G, Kanaghinis T. Bowel preparation and the risk of explosion during colonoscopic polypectomy. *Gut* 1984;25:361-364
- La Brooy S, Avgerinos A, Fendick C, Williams C, Misiewicz J. Potentially explosive colonic concentrations of hydrogen after bowel preparation with mannitol. *Lancet* 1981;1:634-636
- DiPalma JA, Buckley SE, Warner BA, Culpepper RM. Biochemical effects of oral sodium phosphate. *Dig Dis Sci* 1996; 41:749-753
- Marschall HU, Bartels F. Life-threatening complications of nasogastric administration of polyethylene glycol preparations (Golytely) for bowel cleansing. *Gastrointest Endosc* 1998; 47:408-410
- Heymann TD, Chopra K, Nunn E, Coulter L, Westaby D, Murray-Lyon IM. Bowel preparation at home: prospective study of adverse events in elderly people. *BMJ* 1996;313:727-728
- Raymond PL. Mallory-Weiss tear associated with polyethylene glycol electrolyte lavage solution. *Gastrointest Endosc* 1991; 37:410-411
- Brinberg D, Stein J. Mallory-Weiss tear with colonic lavage. *Ann Intern Med* 1986;104:894-895
- Sogge M, Butler M. Mallory-Weiss syndrome induced by the oral electrolyte overload technique for colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 1980;26:51-52
- McBride M, Vanagunas A. Esophageal perforation associated with polyethylene glycol electrolyte lavage solution. *Gastrointest Endosc* 1993;39:856-857
- Gabel A, Muller S. Aspiration: a possible severe complication in colonoscopy preparation of elderly people by orthograde intestine lavage. *Digestion* 1999;60:284-285
- Driman DK, Prekisaitis HG. Colorectal inflammation and increased cell proliferation associated with oral sodium phosphate bowel preparation solution. *Human Pathol* 1998;29: 972-978
- Stapakis J, Thickman D. Diagnosis of pneumoperitoneum:

- abdominal CT vs upright chest film. *Comput Assist Tomogr* 1992;16:713-716
- 38 Macrae F, Tan K, Williams C. Towards safer colonoscopy: a report on the complications of 5000 diagnostic or therapeutic colonoscopies. *Gut* 1983;24:376-383
- 39 Webb W, McDaniel L, Jones L. Experience with 1000 colonoscopic polypectomies. *Ann Surg* 1985;201:626-632
- 40 Waye J, Lewis B, Yessayan S. Colonoscopy: a prospective report of complications. *J Clin Gastroenterol* 1992;15:347-351
- 41 Sinagaram C, Torbey C, Jacoby R. Delayed postpolypectomy bleeding. *Am J Gastroenterol* 1995;90:146-147
- 42 Gibbs D, Opelka F, Beck D, Hicks T, Timmcke A, Gathright J. Postpolypectomy colonic hemorrhage. *Dis Colon Rectum* 1996;39:806-810
- 43 Espinal E, Hoak T, Porter J, Slezak FA. Splenic rupture from colonoscopy. *Surg Endosc* 1997;11:71-73
- 44 Hirata K, Noguchi J, Yoshikawa I, Tabaru A, Nagata N, Murata I. Acute appendicitis immediately after colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2239-2240
- 45 Caprilli R, Viscido A, Frieri G, Latella G. Acute colitis following colonoscopy. *Endoscopy* 1998;30:428-431
- 46 Low D, Shoenut J, Kennedy J, Sharma GP, Harding GK, Den Boer B. Prospective assessment of risk of bacteremia with colonoscopy and polypectomy. *Dig Dis Sci* 1987;32:1239-1243
- 47 Ostyn B, Bercoff E, Manchon N, Louvel JP, Janvresse A, Michot F. Retroperitoneal abscess complicating colonoscopy polypectomy. *Dis Colon Rectum* 1987;30:201-203
- 48 Humphreys F, Hewetson K, Dellipiani A. Massive subcutaneous emphysema following colonoscopy. *Endoscopy* 1984;16:160-161
- 49 Bakker J, van Kersen F, Bellaar Spruyt J. Pneumopericardium and pneumomediastinum after polypectomy. *Endoscopy* 1991;23:46-47
- 50 Waye J, Kahn O, Auerbach M. Complications of colonoscopy and flexible sigmoidoscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1996;6:343-377
- 51 Orsoni P, Berdah S, Verrier C, Caamano A, Sastre B, Boutboul R. Colonic perforation due to colonoscopy: a retrospective study of 48 cases. *Endoscopy* 1997;29:160-164
- 52 Damore L, Rantis P, Vernava A, Longo W. Colonoscopic perforations: etiology, diagnosis, and management. *Dis Colon Rectum* 1996;39:1308-1314
- 53 Farley DR, Bannon MP, Zietlow SP, Pemberton JH, Ilstrup DM, Larson DR. Management of colonoscopic perforations. *Mayo Clin Proc* 1997;72:729-733
- 54 Schlinkert RT, Rasmussen TE. Laparoscopic repair of colonoscopic perforations of the colon. *J Lap Surg* 1994;4:51-54
- 55 Christie J, Marrazzo J. "Mini-perforation" of the colon—not all postpolypectomy perforations require laparotomy. *Dis Colon Rectum* 1991;34:132-135
- 56 Mana F, De Vogelaere K, Urban D. Iatrogenic perforation of the colon during diagnostic colonoscopy: endoscopic treatment with clips. *Gastrointest Endosc* 2001;54:258-259
- 57 Slivka A, Parsons W, Carr-Locke D. Endoscopic band ligation for treatment of post-polypectomy hemorrhage. *Gastrointest Endosc* 1994;40:230-232
- 58 Parra-Blanco A, Kaminaga N, Kojima T, Endo Y, Uragami N, Okawa N. Hemoclippping for postpolypectomy and postbiopsy colonic bleeding. *Gastrointest Endosc* 2000;51:37-41
- 59 Sorbi D, Norton I, Conio M, Balm R, Zinsmeister A, Gostout CJ. Postpolypectomy lower GI bleeding: descriptive analysis. *Gastrointest Endosc* 2000;51:690-696
- 60 Shatz B, Weinstock L, Swanson P, Thyssen E. Long-term safety of India ink tattoos in the colon. *Gastrointest Endosc* 1997;45:153-156
- 61 Lane K, Vallera R, Washington K, Gottfried M. Endoscopic tattoo agents in the colon: tissue responses and clinical implications. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1266-1270
- 62 Park S, Genta R, Romeo D, Weesner R. Colonic abscess and focal peritonitis secondary to India ink tattooing of the colon. *Gastrointest Endosc* 1991;37:68-71
- 63 Nizam R, Siddiqi N, Landas S, Kaplan D, Holtzapfel P. Colonic tattooing with India ink: benefits, risks, and alternatives. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1804-1808
- 64 Price N, Gottfried MR, Clary E, Lawson DC, Baillie J, Mergener K. Safety and efficacy of India ink and indocyanine green as colonic tattooing agents. *Gastrointest Endosc* 2000;51:438-442
- 65 Askin MP, Waye JD, Fiedler L, Harpaz N. Tattoo of colonic neoplasms in 113 patients with a new sterile carbon compound. *Gastrointest Endosc* 2002;56:339-442
- 66 Brown AL, Skehan SJ, Greaney T, Rawlinson J, Somers S, Stevenson GW. Value of double-contrast barium enema after incomplete colonoscopy. *Am J Roentgenol* 2001;176:943-945
- 67 Harned RK, Williams SM, Maglinte DD, Hayes JM, Paustian FF, Consigny PM. Clinical application of in vitro studies for barium-enema examination following colorectal biopsy. *Radiology* 1985;154:319-321
- 68 Harned RK, Consigny PM, Cooper NB, Williams SM, Woltjen AJ. Barium enema examination following biopsy of the rectum or colon. *Radiology* 1982;145:11-16

(张文俊 译 江学良 校 李兆申 审, 200433, 上海市长海路174号, 长海医院消化内科)

肝细胞、胰岛细胞与储脂细胞共培养对肝细胞功能的影响

于聪慧, 林梅, 梅建民, 余昌中, 杨荣华, 姚军波

于聪慧, 林梅, 梅建民, 余昌中, 杨荣华, 姚军波, 北京军区总医院肝胆外科 北京市 100700
国家自然科学基金资助项目, No. 30170421
项目负责人: 于聪慧, 100700, 北京市东城区朝内北小街2号, 北京军区总医院肝胆外科, ychst@public.fhnet.cn.net
电话: 010-66721896
收稿日期: 2004-08-25 接受日期: 2004-09-09

摘要

目的: 探讨肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞共培养对肝细胞功能的影响。

方法: 采用改良胶原酶消化法分离获得大鼠肝细胞和储脂细胞, 同时利用梯度离心分离胰岛细胞。分两组实验, 肝细胞培养组(对照组), 肝细胞用 RPMI1640、胰岛素 10^{-7} mol/L、100 mL/L FBS 及地塞米松 10^{-8} mol/L 配成细胞悬液, 2 mL 放入 9 cm^2 培养瓶中连续培养 15 d (37°C 50 mL/L CO_2)。肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞共培养组(实验组): 将 1×10^7 L 的储脂细胞 2 mL 先加入培养瓶中, 培养条件及培养液同肝细胞培养组, 培养 48 h 后弃上清后将肝细胞 2×10^6 L 2 mL 和胰岛细胞(100个)分别加入并观察肝细胞存活情况; 全自动生化分析仪测定培养上清液中总蛋白及尿素氮的含量; 两组细胞均在培养 10 d 行细胞组织学及组织化学检测, 包括肝细胞 HE 染色、肝细胞内糖原 PAS 染色及葡萄糖-6-磷酸酶染色检测。

结果: 培养第 7 d 对照组部分肝细胞脱落, 核固缩, 胞质破碎分解。而实验组肝细胞粘壁生长好, 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞相间形成团状和索形。培养 10 d 对照组肝细胞核完全固缩, 胞质破碎分解, 糖原、葡萄糖-6-磷酸酶的表达消失; 实验组肝细胞呈片状, 胞质饱满, 糖原、葡萄糖-6-磷酸酶的表达良好。培养 5 d 后实验组白蛋白及尿素氮的合成明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

结论: 肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞共培养明显延长肝细胞存活期。

于聪慧, 林梅, 梅建民, 余昌中, 杨荣华, 姚军波. 肝细胞、胰岛细胞与储脂细胞共培养对肝细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2731-2733
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2731.asp>

0 引言

肝细胞和胰岛细胞混合培养能促进肝细胞功能已有许多报道^[1-2], 但肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞三种细胞混合培养是否能增强肝细胞存活时间研究较少。我们将肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞三种细胞共培养, 观察肝细胞的生长和功能表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 大鼠, δ , 质量 250-300 g, 北京大学医学部医用动物中心提供, 普通饲料喂养, 随意饮水, 室温 $22-28^\circ\text{C}$ 。胶原酶 IV 型, DNA 酶 I 型, Nycodenz 和 Ficoll-400 均购自 Sigma 公司, RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (56°C , 30 min 灭活) 购自华美化学试剂公司, 全自动生化分析仪 (TOSHIBA-7170, 日本), 二氧化碳孵育箱 CI-46 (BAXTER 公司, 美国), 兰格衡流泵 - YZ1515 (保定兰格衡流泵有限公司)。

1.2 方法 采用胶原酶消化法分离大鼠肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞。主要步骤: 首先分离出胆总管和十二指肠, 在胆管开口的上下端结扎十二指肠, 16 G 穿刺针行胆总管穿刺将 0.5 g/L 的胶原酶溶液约 5 mL 缓慢注入, 使胰腺充分膨胀后将穿刺远端的胆总管结扎; 然后将 18 G 的穿刺导针置入门静脉并固定, 同时将肾静脉远端的下腔静脉剪开并剪开膈肌夹闭肝上下腔静脉, 启动循环灌流装置。先灌流 0.2 g/L 的 EDTA (乙二胺四乙酸 Ethylenediamine tetraacetic acid) 溶液, 以 15 mL/min 的灌流速度灌注肝脏, 灌流温度 37°C , 不时地轻揉肝表面, 10 min 左右将灌流液变换为 0.5 g/L 的胶原酶溶液, 与此同时将胰腺解剖剪下放入一含 0.5 g/L 胶原酶溶液的无菌盘内由另一组人员进一步消化分离 (方法见下)。肉眼观察肝脏出现小的裂纹后停止灌流, 将肝脏剪下, 移入装有 HANK'S 液无菌平皿中。

1.2.1 分离肝细胞和储脂细胞组 将平皿放入超净台, 用无菌镊剥去肝表面的包膜, 用肝梳轻轻刮肝表面, 将肝脏的管道系统及纤维弃去, 细胞悬液经 80 目网过滤, 将细胞悬液等份置入两个 50 mL 离心管中并用 RPMI1640+100 mL/L FBS 培养液充分稀释至 50 mL 吹打均匀放低速离心机离心 5 min, 离心速度 300 r/min (20°C), 将上清液移入另外一个 50 mL 的离心管 (以下称 B 管) 中, 此上清液中富含储脂细胞; 有沉淀的管 (以下称 A 管) 富含肝细胞。A 管细胞悬液经 0.2 g/L 胶原酶孵育液 (含 DNA I 酶) 孵育 10 min (37°C 50 mL/L CO_2), 100 目网过滤, 将细胞悬液用 RPMI1640+100 mL/L FBS 培养液离心清洗 3 次, 三次的时间分别是 2, 1.5 和 1 min, 离心速度为 500 r/min (20°C) 即获得肝细胞。B 管细胞悬液经 2 000 r/min 5 min, 弃上清, 加入 0.5 g/L 的胶原酶溶液放入恒温震荡器中消化 30 min (200 r/min, 37°C), 所得细胞悬液经 200 目筛网过滤, 用 RPMI1640+100 mL/L FBS 培养液离心清洗, 反复 3 次。三次的时间分别是 5, 3 min 和 2 min, 离心速度为 2 000 r/min。在所得的沉淀中加入 RPMI1640 液至 12 mL, 再加入 Nycodenz 液 6 mL,

充分吹打混匀.将细胞悬液分别装入两个10 mL的锥型离心管中,在细胞悬液上小心地滴加一层 RPMI1640 液.3 000 r/min 离心 15 min(20 °C),将 RPMI1640 液与细胞悬液交界面间的细胞吸出,用 RPMI1640 液 2 000 r/min 离心冲洗 2 次,每次 7 min (20 °C)即得储脂细胞.

1.2.2 分离胰岛细胞组 将无菌盘放在冰浴上,用小镊子撕去胰腺被膜同时用小剪刀剪碎胰腺组织,将悬液倒入锥形瓶置恒温振荡器中消化 12–16 min (200 r/min, 38 °C),每 5 min 取样 30 μ L 用双硫腙染色观察发现胰岛消化良好时立即用含有 200 mL/L FBS 的培养液离心清洗 2 次.用 200 目网过滤后将沉淀和 250 mL/L Ficoll 4 mL 均匀混合,在其上小心加入 230 mL/L、200 mL/L、110 mL/L 和 RPMI1640 液各 2 mL,高速离心 20 min (3 000 r/min, 20 °C),吸出上两层界面的细胞,用 RPMI1640 液洗涤 2 次即得胰岛细胞.

1.2.3 细胞计数及存活率的判定 采用 4 g/L 台盼蓝溶液鉴定细胞存活率,并将染有台盼蓝的细胞单独计数.按公式计算细胞总数和细胞存活率.

1.2.4 三种细胞混合培养方法 肝细胞培养组(对照组):肝细胞用 RPMI 1640 + 胰岛素 10^{-7} mol/L + 100 mL/L FBS + 地塞米松 10^{-8} mol/L 配成 2×10^8 /L 的肝细胞悬液,将 2 mL 细胞悬液放入 9 cm² 的培养皿中,二氧化碳孵箱连续培养(37 °C 50 mL/L CO₂). 三种细胞共培养组(下称实验组),先将 1×10^7 /L 的储脂细胞 2 mL 加入培养瓶中,培养条件及培养液同肝细胞培养组,培养 48 h 后将培养液弃去,再加入肝细胞 2 mL(2×10^8 /L)和胰岛细胞 100 个/瓶,实验组三种细胞的培养比例为 4 000 : 200 : 1,对照组和实验组分别培养 10 瓶,培养 15 d.培养期间倒置显微镜观察细胞生长情况,隔日收集培养上清液 1 mL 放入试管封存, -20 °C 冰箱冻存待测,全自动生化检测仪检测培养液中总蛋白、尿素氮含量.两组在培养第 10 d 时分别做爬片组织学及组织化学检测,包括肝细胞 HE 染色、肝细胞内糖原 PAS 染色及葡萄糖-6-磷酸酶染色检测.

统计学处理 实验数据采用 mean \pm SD, 结果进行 *t* 检验.

2 结果

2.1 三种细胞的存活率和细胞计数 肝细胞分别为(93.5 \pm 3.5%)和(2.5 \pm 0.2) $\times 10^{11}$ /L, 储脂细胞分别为(90.5 \pm 3.5%)和(1.0 \pm 0.2) $\times 10^7$ /鼠, 胰岛细胞分别为(89.3 \pm 25%)和 462 \pm 125 个/鼠(纯化后).

2.2 两组细胞培养观察结果 在两组细胞培养的过程中通过倒置显微镜观察,实验组在培养 3 d 后肝细胞生长活跃,细胞逐渐形成呈团状和索条状,同时储脂细胞有明显的网状伪足长出,和肝细胞胰岛细胞共同生长,到培养第 10 d 时细胞长成大片状,肝细胞胞质丰满,胞核完整.而对照组肝细胞在培养第 7 d,部分细胞有脱

落,肝细胞质变稀疏,细胞核固缩,第 10 d 大部分细胞脱落.培养第 10 d 肝细胞经 HE 染色,对照组肝细胞胞质分解,细胞核固缩.实验组中 90% 的肝细胞圆形,胞质丰满,胞膜完整,细胞内糖原、葡萄糖-6-磷酸酶的表达正常.

2.3 两组细胞培养液检测结果 (图 1–2) 连续日检测肝细胞功能,结果显示,实验组培养上清液中的总蛋白和尿素氮含量较对照组明显增高, $P < 0.05$.

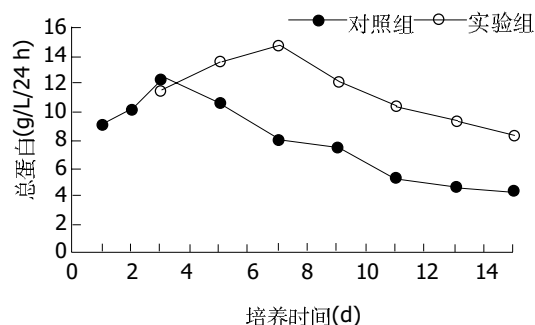


图1 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞混合培养液中白蛋白含量: 培养液总蛋白含量为 4.45 g/L.

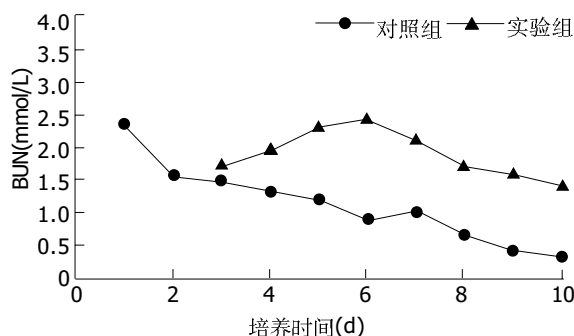


图2 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞混合培养液中尿素氮合成量: 总尿素氮为 0.43 mmol/L.

3 讨论

肝细胞生长需要良好的内环境,胰岛素是肝细胞生长过程中的重要因素之一,能促进肝细胞糖原和蛋白质的合成,同时肝细胞和其共生细胞之间的连接也是肝细胞生长、分裂、细胞间信号传导的重要条件^[3–8],大量的研究表明,肝细胞在生长过程中需要良好的立体结构才能使细胞的功能良好的发挥^[9–12].储脂细胞呈伪足样生长,良好的纤维臂呈网络样,是肝细胞生存的良好框架^[13–15].我们的结果表明,三种细胞培养能够提高肝细胞存活时间和功能表达,但影响因素有多种,其中培养顺序和三种细胞的培养比例是影响细胞生长的重要因素,三种细胞中储脂细胞贴壁时间最长大约 48 h,肝细胞和胰岛细胞贴壁时间相近.我们采取先培养储脂细胞 48 h 后,待观察到储脂细胞已有部分纤维丝伸展出来后再将肝细胞和胰岛细胞接种于上,结果较满意,肝细胞有良好的功能表达,细胞贴壁好,生存

时间明显延长. 另外, 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞的培养比例仍需要进一步摸索. 在实验中, 我们对三种细胞培养比例进行了大量摸索实验(实验结果待发表), 结果发现肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞以 4 000 : 200 : 1 配比培养较为合适. 我们认为肝细胞生长虽然需要良好的框架, 但是在整体的培养体系中, 储脂细胞需要适当的数量才有利于肝细胞的生长, 过多的储脂细胞将会限制肝细胞的生长.

4 参考文献

- 1 Kaufmann PM, Fiegel HC, Kneser U, Pollok JM, Kluth D, Rogiers X. Influence of pancreatic islets on growth and differentiation of hepatocytes in co-culture. *Tissue Eng* 1999;5: 583-596
- 2 Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Herbst H, Rogiers X. Heterotopic hepatocyte transplantation utilizing pancreatic islet cotransplantation for hepatotrophic stimulation: morphologic and morphometric evaluation. *Pediatr Surg Int* 1999;15:168-174
- 3 Murakami S, Ijima H, Ono T, Kawakami K. Development of co-culture system of hepatocytes with bone marrow cells for expression and maintenance of hepatic functions. *Int J Artif Organs* 2004;27:118-126
- 4 Agius L. Metabolic interactions of parenchymal hepatocytes and dividing epithelial cells in co-culture. *Biochem J* 1998; 252:23-28
- 5 Miura K, Nagai H, Ueno Y, Goto T, Mikami K, Nakane K, Yoneyama K, Watanabe D, Terada K, Sugiyama T, Imai K, Senoo H, Watanabe S. Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:415-423
- 6 Arnaud A, Fontana L, Saez-Lara MJ, Gil A, Lopez-Pedrosa JM. Exogenous nucleosides modulate the expression of rat liver extracellular matrix genes in single cultures of primary hepatocytes and a liver stellate cell line and in their co-culture. *Clin Nutr* 2004;23:43-51
- 7 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999;13:1883-1900
- 8 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated co-cultures. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:1137-1160
- 9 Griffith LG, Wu B, Cima MJ, Powers MJ, Chagnaud B, Vacanti JP. *In vitro* organogenesis of liver tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1997;831:382-397
- 10 Kudryavtseva EI, Engelhardt NV. Requirement of 3D extracellular network for maintenance of mature hepatocyte morphology and suppression of alpha-fetoprotein synthesis in vitro. *Immunol Lett* 2003;90:25-31
- 11 De Bartolo L, Bader A. Review of a flat membrane bioreactor as a bioartificial liver. *Ann Transplant* 2001;6:40-46
- 12 Bhandari RN, Riccalton LA, Lewis AL, Fry JR, Hammond AH, Tendler SJ, Shakesheff KM. Liver tissue engineering: a role for co-culture systems in modifying hepatocyte function and viability. *Tissue Eng* 2001;7:345-357
- 13 Rojkind M, Novikoff PM, Greenwel P, Rubin J, Rojas-Valencia L, de Carvalho AC, Stockert R, Spray D, Hertzberg EL, Wolkoff AW. Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *Am J Pathol* 1995;146:1508-520
- 14 Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 1992;15:5-11
- 15 Uyama N, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Okuyama H, Imuro Y, Yamaoka Y. Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells. *J Hepatol* 2002;36:590-599

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

乙型肝炎病毒前-S 蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化

蔺淑梅, 成军, 张树林, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨媛, 白桂琴

蔺淑梅, 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
成军, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨媛, 白桂琴, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒前-S 蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化.

方法: 构建前-S 的酵母细胞表达载体, 采用酵母双杂

交系统筛选人肝细胞cDNA文库, 利用核苷酸数据库及生物信息学技术, 对于筛选结果进行分析. 发现其中有1个未知功能的新基因. 根据GenBank中的序列信息设计引物, 以HepG2细胞系cDNA文库为模板, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长编码序列, 并经测序证实, 命名该新基因为PPSBP9并在GenBank中注册, 注册号为AY553877.

结果: PPSBP9基因的编码序列全长为840个核苷酸(nt), 编码产物由279个氨基酸残基(aa)组成. 经核苷酸序列数据库(GenBank)和蛋白质一级结构序列数据库(SwissProt)同源序列的搜寻, 与已知基因序列和蛋白序列之间没有显著同源性.

结论: 筛选并成功的克隆了乙型肝炎病毒前-S蛋白与肝细胞cDNA文库中结合蛋白新基因PPSBP9, 为进一步

时间明显延长. 另外, 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞的培养比例仍需要进一步摸索. 在实验中, 我们对三种细胞培养比例进行了大量摸索实验(实验结果待发表), 结果发现肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞以 4 000 : 200 : 1 配比培养较为合适. 我们认为肝细胞生长虽然需要良好的框架, 但是在整体的培养体系中, 储脂细胞需要适当的数量才有利于肝细胞的生长, 过多的储脂细胞将会限制肝细胞的生长.

4 参考文献

- 1 Kaufmann PM, Fiegel HC, Kneser U, Pollok JM, Kluth D, Rogiers X. Influence of pancreatic islets on growth and differentiation of hepatocytes in co-culture. *Tissue Eng* 1999;5: 583-596
- 2 Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Herbst H, Rogiers X. Heterotopic hepatocyte transplantation utilizing pancreatic islet cotransplantation for hepatotrophic stimulation: morphologic and morphometric evaluation. *Pediatr Surg Int* 1999;15:168-174
- 3 Murakami S, Ijima H, Ono T, Kawakami K. Development of co-culture system of hepatocytes with bone marrow cells for expression and maintenance of hepatic functions. *Int J Artif Organs* 2004;27:118-126
- 4 Agius L. Metabolic interactions of parenchymal hepatocytes and dividing epithelial cells in co-culture. *Biochem J* 1998; 252:23-28
- 5 Miura K, Nagai H, Ueno Y, Goto T, Mikami K, Nakane K, Yoneyama K, Watanabe D, Terada K, Sugiyama T, Imai K, Senoo H, Watanabe S. Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:415-423
- 6 Arnaud A, Fontana L, Saez-Lara MJ, Gil A, Lopez-Pedrosa JM. Exogenous nucleosides modulate the expression of rat liver extracellular matrix genes in single cultures of primary hepatocytes and a liver stellate cell line and in their co-culture. *Clin Nutr* 2004;23:43-51
- 7 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999;13:1883-1900
- 8 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated co-cultures. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:1137-1160
- 9 Griffith LG, Wu B, Cima MJ, Powers MJ, Chaognaud B, Vacanti JP. *In vitro* organogenesis of liver tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1997;831:382-397
- 10 Kudryavtseva EI, Engelhardt NV. Requirement of 3D extracellular network for maintenance of mature hepatocyte morphology and suppression of alpha-fetoprotein synthesis in vitro. *Immunol Lett* 2003;90:25-31
- 11 De Bartolo L, Bader A. Review of a flat membrane bioreactor as a bioartificial liver. *Ann Transplant* 2001;6:40-46
- 12 Bhandari RN, Riccalton LA, Lewis AL, Fry JR, Hammond AH, Tendler SJ, Shakesheff KM. Liver tissue engineering: a role for co-culture systems in modifying hepatocyte function and viability. *Tissue Eng* 2001;7:345-357
- 13 Rojkind M, Novikoff PM, Greenwel P, Rubin J, Rojas-Valencia L, de Carvalho AC, Stockert R, Spray D, Hertzberg EL, Wolkoff AW. Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *Am J Pathol* 1995;146:1508-520
- 14 Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 1992;15:5-11
- 15 Uyama N, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Okuyama H, Imuro Y, Yamaoka Y. Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells. *J Hepatol* 2002;36:590-599

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

乙型肝炎病毒前-S 蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化

蔺淑梅, 成军, 张树林, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨瑗, 白桂琴

蔺淑梅, 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
成军, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨瑗, 白桂琴, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒前-S 蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化.

方法: 构建前-S 的酵母细胞表达载体, 采用酵母双杂

交系统筛选人肝细胞cDNA文库, 利用核苷酸数据库及生物信息学技术, 对于筛选结果进行分析. 发现其中有1个未知功能的新基因. 根据GenBank中的序列信息设计引物, 以HepG2细胞系cDNA文库为模板, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长编码序列, 并经测序证实, 命名该新基因为PPSBP9并在GenBank中注册, 注册号为AY553877.

结果: PPSBP9基因的编码序列全长为840个核苷酸(nt), 编码产物由279个氨基酸残基(aa)组成. 经核苷酸序列数据库(GenBank)和蛋白质一级结构序列数据库(SwissProt)同源序列的搜寻, 与已知基因序列和蛋白序列之间没有显著同源性.

结论: 筛选并成功的克隆了乙型肝炎病毒前-S蛋白与肝细胞cDNA文库中结合蛋白新基因PPSBP9, 为进一步

研究HBV前-前-S及其肝细胞结合蛋白新基因在HBV致病中的作用奠定了基础。

蔺淑梅, 成军, 张树林, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨媛, 白桂琴. 乙型肝炎病毒前-前-S蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2733-2736

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2733.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染常见, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关^[1-6]. HBV 是很小的包膜病毒, HBV 基因组全长在 3 200 个核苷酸(nt)左右, 为部分双链 DNA 病毒. HBV 至少含有 4 个开放读码框架(ORF), 分别命名为 S、C、P、X 区, 4 个 ORF 中表达的氨基酸长度不同, 其生物学功能也不相同, 其中全 S 区又因不同的起始密码子(ATG)而又人为的分为前-S1、前-S2 和 S 三个区, 前-S1、前-S2 和表面抗原主蛋白是按照同一开放读码顺序(in frame)进行翻译的. 最近董菁 *et al* 对于中国 HBV 流行株的全基因组序列进行克隆和序列分析, 发现在前-S1 区之前还存在一个 ORF, 长度 135 bp, 编码 45 aa, 将其命名为前-前-S 区. 并在既往已克隆的 HBV 基因组中得到了证实^[7]. 杨倩 *et al* 对前-前-S 基因启动子序列的鉴定和转录活性的研究证实, 前-前-S- 基因 ORF 上游的序列具有启动子活性, 进一步证实了董菁 *et al* 发现的前-前-S 编码基因存在^[8]. 基因是通过蛋白质之间的相互作用而实现其功能的, 病毒蛋白和肝细胞蛋白之间的作用是病毒致病的关键. 为进一步研究前-前-S- 基因在 HBV 致病中的作用, 我们利用酵母双杂交技术对肝细胞 cDNA 文库中与乙型肝炎病毒前-前-S 相互作用的蛋白进行研究, 获得了一种能与 HBV 前-前-S 蛋白结合的未知功能蛋白, 将编码该蛋白的基因命名为 PPSBP9, 对其进行克隆化研究, 为今后进一步深入地研究新基因的生物学功能鉴定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 pGBKT7-BD 克隆载体, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、人 cDNA 肝细胞文库等均购自 Clontech 公司. 酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基, X- α -半乳糖苷酶(Gal)等购自 Clontech 公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司. 复杂高效感受态(FSB), 本室自制. 大肠杆菌(DH5 α), 本室保存. Taq 酶、T4 DNA 连接酶、*EcoRI*、*BamHI* 等限制性内切酶、pGEM-T 载体及 RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司. 玻璃奶回收试剂盒购自博大公司. 新基因 PPSBP9 的扩增引物合成及 DNA 序列测定由上海生工生物工程技术有限公司承担.

1.2 诱饵质粒载体的构建及酵母配合实验 用多聚酶链反应(PCR)法扩增 HBV 前-前-S 蛋 7 中构建诱饵质粒, 酶切鉴定后, 用醋酸锂法转入酵母细胞 AH109, 并在四缺培养基上培白编码基因, 连接入酵母表达载体 pGBKT- 养以排除其自身激活作用^[9]. 挑取 3 mm 大小在 SD/-Trp 培养基上生长的转化了 pGBKT7-前-前-S 质粒的酵母 AH109 单菌落接种于 SD/-Trp 培养基中, 30 °C 250 r/min 振荡过夜, 次日离心后用 2 × YPDA 培养液 5 mL 重悬细胞, 计数浓度大于 1×10^9 细胞/mL, 与肝细胞文库酵母细胞在 50 mL 2 × YPDA 中 30 °C 轻摇配合约 22 h, 离心后用 0.25 × YPDA 8 mL 重悬细胞, 分别铺板于 150 mm 的 SD/-Trp/-Leu/-His(3 缺), SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (4 缺)培养基板各 25 块上, 同时将配合产物按 1:100、1:1 000、1:10 000 铺于 SD/-Trp、SD/-Leu 及 SD/-Trp/-Leu 培养基上检验配合效率. 生长 10-14 d 后挑取直径大于 3 mm 的菌落再次画线于铺有 X- α -gal 的 4 缺培养基上检查 α - 半乳糖苷酶活性, 认为在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落.

1.3 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 比对, 进行生物信息学分析.

1.4 多聚酶链反应(PCR)扩增 PPSBP9 新基因 根据 GenBank 的序列信息设计上下游引物. 上游引物: 5' -GAA TTC ATG CCA TAT ATT CCT CTC A-3', 下游引物: 5' -GGA TCC CTA ATA CAA ATG TAT GTG G-3'. 提取 HepG2 细胞的总 RNA, 进行反转录, 以反转录产物为模板进行 PCR, PCR 参数如下: 94 °C 5 min 预变性, 94 °C 1 min 变性, 58 °C 1 min 退火, 72 °C 1 min 延伸, 共 35 个循环, 72 °C 再延伸 10 min.

1.5 克隆目的片段 将 PCR 产物在 12 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 切取目的片段, 玻璃奶法回收 PCR 产物, 与 pGEM-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 15 h. 挑取阳性菌落, 增菌. 提取质粒进行限制性酶切分析鉴定, 选择经鉴定的菌落送测序.

2 结果

2.1 pGBKT7-p-p-S 诱饵与肝细胞文库酵母菌株配合结果 我们共挑选 54 个阳性克隆测序, 测序结果与 GenBank 数据库进行初步比较, 其中 8 个克隆为未知功能蛋白基因. 其余 46 个均与已知基因序列高度同源.

2.2 新基因的序列分析及全长基因的获得 对所筛选到的未知功能蛋白基因其中之一利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN), 发现该克隆序列与 GenBank 中注册的

已知功能基因序列没有同源. 电子拼接推定该基因的开放读码框架, 设计引物, 从HepG2细胞提取总RNA后, 进行RT-PCR, PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见1条清晰、单一、大小约840 bp的特异性扩增条带(图1), 其大小与预计的相吻合. PCR产物与T-载体连接, 转化大肠杆菌, 提取质粒进行酶切鉴定后送测序. 测序结果完全符合拼接序列, 表明我们已成功克隆出新基因的完整序列, 命名为PPSBP9, 其编码序列全长为840个核苷酸, 编码产物由279个氨基酸残基组成(图2). GenBank注册号为AY553877.

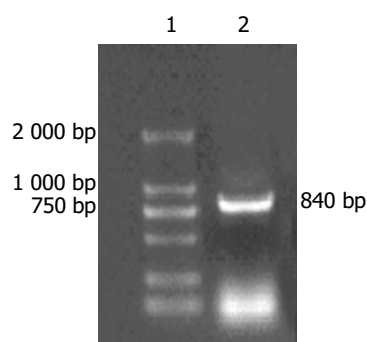


图1 PPSBP9基因的RT-PCR产物凝胶电泳图. 1: DNA marker; 2: PCR product.

ATG CCA TAT ATT CCT CTC ATG GAG TTC AGT
M P Y I P L M E F S
TGT TCA CAT TCT CAC TTA GTA TGC TTA CCC
C S H S H L V C L P
GCA GAG TGG AGG ACT AGC TGT ATG CCC AGT
A E W R T S C M P S
TCC AAA ATG AAG GAG ATG AGC TCG TTA TTT
S K M K E M S S L F
CCA GAA GAC TGG TAC CAA TTT GTT CTA AGG
P E D W Y Q F V L R
CAG TTG GAA TGT TAT CAT TCA GAA GAG AAG
Q L E C Y H S E E K
GCC TCA AAT GTA CTG GAA GAA ATT GCC AAG
A S N V L E E I A K
GAC AAA GTT TTA AAA GAC TTT TAT GTT CAT
D K V L K D F Y V H
ACA GTA ATG ACT TGT TAT TTT AGT TTA TTT
T V M T C Y F S L F
GGA ATA GAC AAT ATG GCT CCT AGT CCT GGT
G I D N M A P S P G
CAT ATA TTG AGA GTT TAC GGT GGT GTT TTG
H I L R V Y G G V L
CCT TGG TCT GTT GCT TTG GAC TGG CTC ACA
P W S V A L D W L T
GAA AAG CCA GAA CTG TTT CAA CTA GCA CTG
E K P E L F Q L A L
AAA GCA TTC AGG TAT ACT CTG AAA CTA ATG
K A F R Y T L K L M

ATT GAT AAA GCA AGT TTA GGT CCA ATA GAA
I D K A S L G P I E
GAC TTT AGA GAA CTG ATT AAG TAC CTT GAA
D F R E L I K Y L E
GAA TAT GAA CGT GAC TGG TAC ATT GGT TTG
E Y E R D W Y I G L
GTA TCT GAT GAA AAG TGG AAG GAA GCA ATT
V S D E K W K E A I
TTA CAA GAA AAG CCA TAC TTG TTT TCT CTG
L Q E K P Y L F S L
GGG TAT GAT TCT AAT ATG GGA ATT TAC ACT
G Y D S N M G I Y T
GGG AGA GTG CTT AGC CTT CAA GAA TTA TTG
G R V L S L Q E L L
ATC CAA GTG GGA AAG TTA AAT CCT GAA GCT
I Q V G K L N P E A
GTT AGA GGT CAG TGG GCC AAT CTT TCA TGG
V R G Q W A N L S W
GAA TTA CTT TAT GCC ACA AAC GAT GAT GAA
E L L Y A T N D D E
GAA CGT TAT AGT ATA CAA GCT CAT CCA CTA
E R Y S I Q A H P L
CTT TTA AGA AAT CTT ACG GTA CAA GCA GCA
L L R N L T V Q A A
GAA CCT CCC CTG GGA TAT CCG ATT TAT TCT
E P P L G Y P I Y S
TCA AAA CCT CTC CAC ATA CAT TTG TAT TAG
S K P L H I H L Y *

图2 PPSBP9基因的核苷酸序列及编码产物一级结构序列.

3 讨论

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白-蛋白相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下相互作用提供了一种新的遗传学方法. 我们利用此技术, 已成功筛选到一系列与乙肝病毒蛋白及丙肝病毒蛋白相结合的蛋白基因, 其中, 也包括了一些未知功能蛋白的基因^[9-11].

1979年Galibert *et al*^[12-13]首次报告了HBV基因组的全序列, 并确定4个主要的开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区, 一直沿用至今. HBV基因组只有3.2 kb, 其结构特点是结构基因与功能基因序列之间重叠, 甚至结构基因序列之间重叠^[14]. 关于这一紧密DNA结构中是否存在新的编码序列, 一直没有进行系统的研究. 最近董菁 *et al*^[7-8, 15-19]对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现了前-S和前-X基因序列, 改写了HBV DNA编码基因序列研究的历史.

HBV表面抗原即外膜蛋白不仅是病毒遗传结构的包装蛋白, 病毒感染所必需, 也是引起宿主保护性应

答的免疫原表位,而且截短型表面抗原中蛋白和大蛋白具有反式激活作用^[7],这种功能是与表面抗原的多种形式激活癌基因有关^[20]。董菁*et al*进一步应用DNA SIS软件的蛋白质分析功能分析了前-前-S、前-S1、前-S2和S基因的完全表达产物,前-前-S区较以往认为的大蛋白多出一个小的疏水区,那么全S蛋白(含前-前-S区)与大蛋白有不小的差异。其中的19(21)个疏水氨基酸在前-前-S区形成了一个小的疏水功能域,可能与蛋白的空间折叠或表面蛋白合成后分泌有关。进一步研究前-前-S所编码蛋白的功能及与之相互作用的蛋白具有重要意义。

我们应用酵母双杂交技术成功的筛选出肝细胞文库中与前-前-S蛋白相互作用的蛋白基因54种,其中包括HBV前-前-S蛋白结合蛋白9这一未知功能的新基因。根据GenBank的信息,电子拼接推定该基因的开放读码框架获得相应的全长编码基因,我们设计了新基因的上下游引物,并成功地从HepG2细胞的mRNA中逆转录出该基因的完整序列。PCR反应产物经T-A克隆测序完全符合计算机分析结果,表明我们已顺利得到了该新基因的编码序列,其编码序列全长为840个核苷酸,编码279个氨基酸残基。值得我们关注的是,在对这一未知功能新基因进行进一步生物信息学分析时发现,我们这一研究小组在用酵母双杂交技术筛选HCV F蛋白与肝细胞文库相互作用的蛋白时也筛选到这一相同的未知功能的新基因,故我们将其命名为PPSBP9/HCVFbp2。表明这一未知功能基因能与多种病毒蛋白结合,提示这一未知功能基因可能在HBV, HCV感染的致病过程中发挥重要作用。新基因的发现及克隆化成功为今后进一步深入地研究新基因的生物学功能奠定了基础。

4 参考文献

- 1 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000:1
- 2 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列准种个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 3 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 4 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 5 Walton CM, Wu CH, Wu GY. A ribonuclease H-oligo DNA conjugate that specifically cleaves hepatitis B viral messenger RNA. *Bioconjug Chem* 2001;12:770-775
- 6 Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002;277:24361-24367
- 7 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 8 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:761-762
- 9 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBeAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 10 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5B结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. 解放军医学杂志 2003;28:768-770
- 11 王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 梁耀东, 刘敏. 应用白细胞表达型cDNA文库的酵母双杂交技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白5A的结合蛋白. 中西医结合肝病杂志 2003;13:340-342
- 12 Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 1979;281:646-650
- 13 Charnay P, Mandart E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P, Galibert F. Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Nucleic Acids Res* 1979;7:335-346
- 14 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68
- 15 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1097-1101
- 16 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 王琳, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:765-767
- 17 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 李莉. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 18 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 19 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. HBsAg与抗-HBs同时阳性者体内S基因序列分析. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 20 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000:96-100

应用噬菌体展示技术筛选 HBsAg 启动子 I 的 DNA 结合蛋白

杨艳杰, 成军, 陈东风, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖

杨艳杰, 成军, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100038
陈东风, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科 重庆市 400038
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-06-09

摘要

目的: 通过筛选HBsAg基因启动子I(SPI, surface promoter I)结合蛋白, 为HBV复制机制的研究探索新的途径。

方法: 应用噬菌体展示技术, 以HBsAg基因启动子I的聚合酶链反应(PCR)产物DNA作为固相筛选分子, 对噬菌体人肝细胞cDNA文库进行4轮“黏附-洗脱-扩增”筛选过程, 经噬斑的PCR扩增后, 构建克隆载体, 最后对所筛选克隆进行DNA序列分析和同源性搜索。

结果: 噬菌体经富集后, 从随机筛选的14个克隆中得到8个阳性克隆, 成功构建了克隆载体。序列测定后经过同源性搜索, 确定了和HBV表面抗原基因启动子I特异结合的肝细胞蛋白, 共编码7种蛋白。其中3个克隆编码未知功能蛋白; 其余的克隆分别编码4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白、复制蛋白等蛋白。

结论: 用噬菌体人肝cDNA文库筛选得到HBsAg基因启动子I的结合蛋白, 分析了该蛋白的编码基因。

杨艳杰, 成军, 陈东风, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖. 应用噬菌体展示技术筛选 HBsAg 启动子 I 的 DNA 结合蛋白. 世界华人消化杂志 2004; 12(11):2737-2739
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2737.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)持续感染导致全球性健康问题。世界人口约6%是病毒携带者, 因此HBV是慢性肝病的重要病原体, 且是引发肝细胞癌(HCC)的重要因素^[1-5], 而病毒基因组编码的蛋白与宿主肝细胞之间的相互作用, 可能是病毒致肝细胞癌的重要分子机制^[6-12]。HBV基因组分为结构基因序列和调节基因序列两大部分。调节基因序列和结构基因序列相互重叠, 即使结构基因序列本身也有部分重叠, 因此, HBV具有结构紧密的特点。HBsAg基因含有两个串联的启动子SPI和SPII。其中SPI(2 219-2 780 nt)调节2.4 kb mRNA的转

录, 编码表面抗原大蛋白。在HBV复制中具有十分重要的作用。SPI含有典型TATA盒序列, 其上游50 bp处为肝细胞特异性核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)I结合位点。该结合位点是HBV转录调节的重要组成部分, 也是HBV嗜肝性的重要原因之一; 这一位点可能还有其他肝特异因子与之结合, 从而调节2.4 kb mRNA的转录^[13-14]。另外, SPI的腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)核苷酸丰富区中还有一个AFP-I(一种可与AFP基因的增强子及启动子结合的核因子)结合位点, 也可能与肝细胞特异性的转录有关。因此, 作为指导前-S基因组RNA转录的SPI启动子在HBV的生活周期中具有十分重要的作用。为了寻找与SPI结合的肝特异性转录作用因子, 进一步探讨SPI的转录调节机制, 我们应用噬菌体展示技术, 利用人肝细胞cDNA文库, 以生物素化的SPI的DNA作为固相分子进行筛选, 研究影响HBV DNA复制的肝细胞蛋白的结构和功能。

1 材料和方法

1.1 材料 T7 select 人肝细胞cDNA文库, 受体菌BLT5615 (Novagen公司), 质粒pGEM-Teasy和pcDNA3.1(-) (Promega公司), Taq酶、琼脂糖、dNTP、T4连接酶、RNA酶、玻璃奶DNA回收试剂盒(博大科技), EcoRI、BamHI、MluI、NheI (购于宝生物公司), 热循环仪、凝胶成像仪、酶联吸附读数仪、大肠杆菌DH5 α 、pCP10质粒为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 肝细胞cDNA文库的筛选 HBV SPI启动子的扩增根据HBV *ayw*的基因序列, 在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡核苷酸引物, 并用生物素标记, P1: 5' -ACG CGT GAA CAT CTA GTT AAT C-3', P2: 5' -GCT AGC GCT GTA GAT CTT GTT C-3' 在引物5'端分别引入MluI和NheI位点, 由赛百盛公司合成。在0.5 mL Ep管中依次加入17 μ L双蒸水, 2.5 μ L的10 \times 缓冲液(含20 mmol/L MgCl₂), 2 μ L 2 mmol/L dNTP, 1 μ L 12.5 μ mol/L P1和P2, 1 μ L pCP10质粒, 0.5 μ L Taq酶(5 Mu/L)。放入PE 9 600 PCR仪中扩增。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C变性60 s, 57 $^{\circ}$ C退火60 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 循环33次后, 72 $^{\circ}$ C保温10 min。10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。玻璃奶法回收DNA片段。文库扩增: 将BLT5615新鲜克隆在3 mL LB/Amp内振摇, 37 $^{\circ}$ C过夜。在3 mL LB/Amp内加入30 μ L振摇细菌, 将细菌浓度摇至A₆₀₀值0.5, 加入30 μ L IPTG, 再振摇30 min后加入噬菌体文库5 μ L。37 $^{\circ}$ C振摇1-3 h直到观察到

细菌裂解. 8 000 *g* 离心 10 min, 将上清移至另一无菌 Ep 管中, 4 °C 保存. 链亲和素 20 μ L (1 g/L) 包被微孔板, 4 °C 过夜. 1 \times TBS 洗涤, 加入 100 μ L SP I 启动子 DNA 回收片段, 4 °C 过夜. 1 \times TBST (5 g/L Tween-20) 洗涤 5 遍, 加入文库扩增裂解液 100 μ L, 4 °C 过夜. 1 \times TBST 洗板 5 次, 加入 100 μ L T7 洗脱缓冲液, 室温孵育 20 min, 将洗脱液移至另一无菌 Ep 管中. 将 15 μ L 洗脱噬菌体加入 3 mL 中对数生长期的细菌培养液, 37 °C 振荡培养, 直到看到细菌裂解. 8 000 *g* 离心 10 min, 将上清移到一新 Ep 管, 4 °C 保存备下一轮筛选用. 每轮筛选后, 均做噬斑分析. 按上述步骤再筛选 5 遍.

1.2.2 噬斑的 PCR 扩增 刮取第 5 轮筛选后的阳性噬斑, 置于 100 μ L pH 8.0 的 10 mol/L EDTA 的 Ep 管中, 65 °C 加热 10 min, 14 000 *g* 离心 10 min 至澄清. 在 0.5 mL 管中依次加入 40 μ L 双蒸水, 5 μ L 的 10 \times 缓冲液 (含 20 mmol/L MgCl₂), 4 μ L 2 mmol/L dNTP, 1 μ L 12.5 μ mol/L T7 select 上游引物 P3: 5' -GGA GCT GTC GTA TTC CAG TC-3' 和下游引物 P4: 5' -AAC CCC TCA AGA CCC GTT TA-3', 1 μ L pCP10 质粒, 0.5 μ L Taq 酶 (5 Mu/L) 放入 PE 9 600 PCR 仪中扩增. 扩增条件: 94 °C 变性 60 s, 50 °C 退火 55 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 35 次后, 72 °C 保温 10 min. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果. 玻璃奶法回收 DNA 片段.

1.2.3 序列比对和同源性分析 将纯化的噬斑 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体混合, 在 16 °C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒, 进行酶切鉴定. 以酶切鉴定阳性的重组子为模板, 进行目的基因的 DNA 序列测定, 序列测定由上海博亚生物公司完成. 同源性搜索由以下网址上的 BLASTn 软件完成 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>).

2 结果

2.1 肝细胞 cDNA 文库的筛选 以固相化的 SPI 启动子 DNA 片段作为支持分子, 对肝细胞 cDNA 文库进行 4 轮 “吸附-洗脱-扩增” 的筛选. 噬菌体的富集结果见表 1. 从固相平板洗脱的噬菌体数显示了明显的增加趋势, 第 4 轮与第 1 轮相比, 富集了 356 倍 (富集倍数 = 第 4 轮产出率 / 第 1 轮产出率 产出率 = 洗脱的噬菌体数量 / 所用的噬菌体数量).

表 1 亲和筛选对噬菌体的富集

筛选次数	噬菌体数		产出率
	投入	捕获	
第 1 轮	3.5×10^8	2.5×10^{11}	7.1×10^2
第 2 轮	2.5×10^{11}	2.6×10^{15}	1.0×10^4
第 3 轮	2.6×10^{15}	1.5×10^{20}	5.8×10^4
第 4 轮	1.5×10^{20}	3.8×10^{25}	2.5×10^5

2.2 目的基因的 PCR 扩增 经过 4 轮筛选, 随机挑取 14 个噬斑为模板, 用 T7 select 引物进行 PCR 扩增, PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 结果产生片段大小不等的条带 (图 1), 用同一噬斑裂解液重复 PCR 得到相同结果.

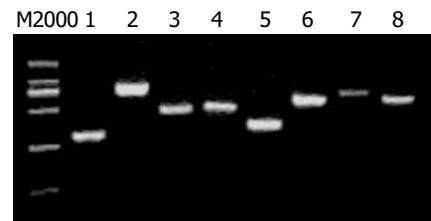


图 1 阳性噬斑裂解液 PCR 扩增.

2.3 序列比对和同源性分析 对阳性克隆基因的 DNA 序列测定, 及根据 GenBank 数据库提供的数据库进行 BLASTn 同源性搜索, 8 个阳性克隆筛选到启动子 DNA 结合蛋白, 共编码 7 种蛋白. 其中 3 个克隆编码未知功能蛋白; 其余的克隆分别编码 4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白、复制蛋白等蛋白 (表 2).

表 2 应用噬菌体展示技术筛选到的阳性克隆

编号	编码蛋白	同源性 (%)	克隆数
1	isolate 183 mitochondrion (孤立线粒体 183)	99	1
2	RF-C/activator 1 homolog (释放因子 C/激活因子 1 同源体)	100	1
3	hypothetical protein MGC9515 (人类假想蛋白 MGC9515)	99	2
4	haptoglobin (触珠蛋白)	99	1
5	4-aminobutyrate aminotransferase (4-氨基丁酸氨基转移酶)	100	1
6	chromosome 3 clone RP11-801L18 (复制蛋白 11-801L18)	100	1
7	hypothetical protein FLJ22056 (人类假想蛋白 FLJ22056)	100	1

3 讨论

作为调节元件的一段 DNA 序列, 可与某些细胞蛋白或病毒蛋白结合, 正性或负性调节转录. HBV 的 SP I 启动子是 HBV 的一个重要调节元件. 转录因子 HNF1 和 HNF3 对 SP I 的转录调节具有重要作用, 他们作用的位置在肝脏而不在其他组织. 这两种因子协同作用可能抑制 2.4 kb mRNA 的转录. 在多聚腺苷酸 (PolyA) 加尾信号、糖皮质激素应答元件 (GRE)、增强子 I (ENH I)、增强子 II (ENH II) 和 HBxAg 及其他的细胞因子作用下顺式或反式激活 SP I, 开始发挥调节功能^[15-16]. SP I 调节 2.4 kb 的 mRNA 转录, 编码大蛋白. 对 HBV 转基因鼠的研究显示, 2.4 kb mRNA 在肝组织内呈严格分布, 具有高度的嗜肝性. 由于大蛋白的增加易导致病毒包膜蛋白在细胞内蓄积, 引起细胞病变效应^[17-18]. HBV 各种包膜蛋白的这种比例不仅有利于感染性 HBV 颗粒成熟和释放, 而且有利于宿主细胞的生存, 使二者能共生共存^[19-20]. 因此, 3 种外膜蛋白的产量有正常比例, 大蛋白过量时, 将顺式干扰 SP II, 从而降低基因的转

录水平. Li *et al*^[21]从1例慢性肝炎患者血清中分离到S基因启动子缺失变异株, 转染肝癌细胞后, 大蛋白过度表达, 而中、主蛋白表达减少, 因而病毒及亚病毒颗粒的分泌都受到抑制, 肝细胞内大蛋白堆积, 认为可能是慢性肝炎肝细胞毛玻璃样变性的原因. 他们进一步研究发现, 过度表达的大蛋白在肝细胞内质网通过激活grp78和grp94启动子, 改变宿主细胞的生理功能^[22-24]. 转基因小鼠模型已经证实, 若大蛋白过度表达, 在肝细胞内堆积, 将导致肝细胞内质网肿胀, 肝细胞变性. 因此, 在感染过程中, 改变大、中、小蛋白的比例将影响疾病的进程.

我们以已知启动子DNA序列筛选出与其相结合的蛋白编码基因, 通过生物信息分析来确定该蛋白质的名称. 经过4轮“吸附-洗脱-扩增”筛选过程, 结果得到了8个阳性克隆, 共表达7种蛋白. 其中有3个为未知功能蛋白, 对已知功能蛋白, 如4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白(haptoglobin)、复制蛋白等蛋白的结合作用, 尚未见有文献报道, 需体外结合及真核细胞共转染等实验进一步证实. 总之, 本实验应用噬菌体展示技术, 试图寻找与HBV SPI启动子结合的肝特异蛋白及HBV、特别是表面抗原大蛋白严格嗜肝性的原因, 探索病毒表面抗原大蛋白转录、翻译的调控机制. 通过本实验, 我们筛选到了一些与SPI启动子序列特异结合的蛋白, 为今后更好地了解HBV的转录调控机制及其生活史打下了基础.

4 参考文献

- Dai LC, Yao X, Lu YL, Ping JL, Zhang BW, Ni CR. Expression of midkine and its relationship with HBV infection in hepatocellular carcinomas. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:1691-1693
- Huo TI, Wu JC, Lui WY, Lee PC, Huang YH, Chau GY, Tsay SH, Chang FY, Lee SD. Diabetes mellitus is a recurrence-independent risk factor in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma undergoing resection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:1203-1208
- Fujioka S, Shimomura H, Iwasaki Y, Fujio K, Nakagawa H, Onishi Y, Takagi S, Taniguchi H, Umeoka F, Nakajima H, Moriya A, Nanba K, Piao CY, Shinji T, Koide N, Shiratori Y. Hepatitis B virus gene in liver tissue promotes hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Dig Dis Sci* 2003;48:1920-1924
- Wang T, Wang Y, Wu MC, Guan XY, Yin ZF. Activating mechanism of transcription NF-kappaB regulated by hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:356-360
- Kwon JA, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral core protein (HBc) in human liver cells. *Biol Chem* 2003;384:203-212
- 柯亨宁, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹, 田秀兰. 表面抗原DNA疫苗诱导小鼠体液免疫及抑制转基因鼠表面抗原的产生. *中华内科杂志* 2000;39:319-322
- 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 董菁, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. *肝脏* 2000;5:130-132
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003;124:327-334
- Raimondo G, Costantino L, Caccamo G, Pollicino T, Squadrito G, Cacciola I, Brancatelli S. Non-sequencing molecular approaches to identify preS2-defective hepatitis B virus variants proved to be associated with severe liver diseases. *J Hepatol* 2004;40:515-519
- Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *China J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究. *中华医学杂志* 2002;82:81-85
- Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-262
- Cai YN, Zhou Q, Kong YY, Li M, Viollet B, Xie YH, Wang Y. LRH-1/hB1F and HNF1 synergistically up-regulate hepatitis B virus gene transcription and DNA replication. *Cell Res* 2003;13:451-458
- Schulte-Frohlinde E, Seidler B, Burkard I, Freilinger T, Lersch C, Erfle V, Foster GR, Classen M. Different activities of type I interferons on hepatitis B virus core promoter regulated transcription. *Cytokine* 2002;17:214-220
- Li J, Xu Z, Zheng Y, Johnson DL, Ou JH. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins. *J Virol* 2002;76:5875-5881
- Waris G, Siddiqui A. Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hepatitis B virus enhancer 1 function. *J Virol* 2002;76:2721-2729
- Tu Y, Qi Z, Yang P, Pan Y, Yu S, Du M, Li G. Transgenic mice model of human hepatitis B virus x gene. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2000;22:263-265
- Raney AK, Eggers CM, Kline EF, Guidotti LG, Pontoglio M, Yaniv M, McLachlan A. Nuclear covalently closed circular viral genomic DNA in the liver of hepatocyte nuclear factor 1 alpha-null hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2001;75:2900-2911
- Bock CT, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology* 1999;29:1236-1247
- Cha JY, Kim H, Kim KS, Hur MW, Ahn Y. Identification of transacting factors responsible for the tissue-specific expression of human glucose transporter type 2 isoform gene. Co-operative role of hepatocyte nuclear factors 1alpha and 3beta. *J Biol Chem* 2000;275:18358-18365
- Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor. *J Virol* 2001;75:8400-8406
- Reifenberg K, Wilts H, Lohler J, Nusser P, Hanano R, Guidotti LG, Chisari FV, Schlicht HJ. The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression in vivo. *J Virol* 1999;73:10399-10405
- Xu Z, Yen TS, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, Ou JH. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol* 2002;76:2579-2584
- Barnabas S, Andrisani OM. Different regions of hepatitis B virus X protein are required for enhancement of bZip-mediated transactivation versus transrepression. *J Virol* 2000;74:83-90

抗肝癌人源化 Diabody 在大肠杆菌中的可溶性表达及活性鉴定

孙志伟, 赵君, 王双, 俞炜源, 刘彦仿

孙志伟, 王双, 俞炜源, 军事医学科学院生物工程研究所 北京市 10071
赵君, 刘彦仿, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室
陕西省西安市 710032
国家自然科学基金资助, No. 30171065
项目负责人: 孙志伟, 100071, 北京市军事医学科学院生物工程研究所蛋白
质工程研究室, szwyh@263.net
电话: 010-66948819 传真: 010-63833521
收稿日期: 2004-08-30 接受日期: 2004-10-11

摘要

目的: 构建人源化抗肝癌双价抗体, 并实现其在大肠杆菌中的可溶性表达。

方法: 缩短人源化抗肝癌单链抗体 hscFv₂₅ 的连接肽为 5 肽, 构建(hscFv₂₅)₂ 基因, 克隆入原核表达载体后, 转化入大肠杆菌表达, 并纯化目的蛋白, 细胞 ELISA、免疫组织化学法检测其生物活性。

结果: 目的基因在大肠杆菌中得到了可溶性表达, 纯化蛋白的相对亲和力比亲本抗体提高了 10 倍左右, 对肝癌组织切片的免疫组织化学染色呈强阳性, 阳性率为 75%。

结论: 成功制备了人源化抗肝癌双价抗体, 该抗体具有较高的亲和力, 为进一步的临床研究奠定了基础。

孙志伟, 赵君, 王双, 俞炜源, 刘彦仿. 抗肝癌人源化 Diabody 在大肠杆菌中的可溶性表达及活性鉴定. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2740-2742
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2740.asp>

0 引言

Diabody 是单链抗体的二聚体形式, 相对分子质量大约 M_r 55 000 的双价抗体, 具有较高的亲和力和较强的穿透能力, 同时血清廓清时间又比较合适, 因此是比较理想的肿瘤放射免疫诊断和治疗载体^[1]。我们已经制备了一株亲和力较好、特异性较高的人源化抗肝癌单链抗体 hscFv₂₅, 该抗体具有良好的靶向定位功能^[2]。我们将 hscFv₂₅ 的连接肽改成 5 肽(GGGGS), 构建人源化抗肝癌双价抗体基因并在大肠杆菌中对该基因进行可溶性表达研究, 目的获得高亲和力的人源化抗肝癌双价抗体(hscFv₂₅)₂, 为进一步的临床应用研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 *E.coli* BL21(DE3)菌株为本室保存。表达载体 pTIG 为军事医学科学院生物工程研究所赵志虎副研究员惠赠, 含促进可溶性表达的伴侣分子硫氧还蛋白基因(Trx), Trx 与下游抗体基因之间引入了翻译终止启动序列 TAAATG。IPTG、琼脂糖、SDS-PAGE 所用材料及限制性内切酶等, 购自 Sigma 公司。Taq DNA 聚合

酶和 T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品。PCR 引物由上海生物工程公司合成, 序列如下: P1: 5' -CGGAATTCTAAATGGAGCTACAGCTGGTTGA ATC-3' (V_H 5' 端引物, 引入 *EcoR* I 酶切位点和终止启动序列 TAAATG); P2: 5' -CAGGAGCTCTGG AACTGGCCTGGCTT-3' (V_H 3' 端引物, 3' 端引入 *SacI* 酶切位点); P3: 5' -CGGAGCTC GGAGGTGGAGGTTCTATGACCCAGACTCC ATCTCC-3' (V_L 5' 端引物, 包含 5 肽 Linker 和引入的 *SacI* 酶切位点); P4: 5' -CCCAAGCTTACGCGTTCC AGCGGA TCCGG-3' (3' 端引物, 于模板上 V_L 3' 端后面的检测标签 E-tag 相配对, 同时引入 *Hind* III 酶切位点)。

1.2 方法

1.2.1 重链可变区(V_H)、含 5 个连接肽的轻链突变体(Linker-V_L-E-tag)基因的 PCR 扩增 以 pTIG-hscFv₂₅-E-tag 为模板, P1 和 P2 为引物, PCR 扩增 V_H 基因片段; 以 P3 和 P4 为引物, PCR 扩增 Linker-V_L-E-tag 基因片段。

1.2.2 重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 的构建 上述 PCR 产物经胶回收后分别用 *EcoR* I、*SacI* 和 *SacI*、*Hind* III 酶切并与 *EcoR* I、*Hind* III 酶切的表达载体 pTIG 大片段进行 3 片段连接, 构建重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂, 转化 *E.coli* BL21(DE3)感受态细菌, 碱裂解法提取质粒并用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 对酶切鉴定阳性克隆进行序列测定。

1.2.3 诱导表达 含重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 的宿主菌 BL21(DE3), 以 IPTG(终浓度为 0.2 mmol/L)于 28 °C 诱导表达 6 h, 离心收集菌体, 超声碎菌。进行 12% SDS-PAGE 及以鼠抗 E-tag 抗体为二抗的 Western blot 鉴定。

1.2.4 可溶性表达产物的纯化 诱导表达 pTIG(hscFv₂₅)₂ 菌体 100 mL, 离心收集菌体, 超声碎菌 15 min 后, 取上清, 用 Ni-NTA Agarose 亲和层析法纯化表达产物(载体多克隆位点下游含 6×His)。表达产物的纯度采用 SDS-PAGE 鉴定, 经核酸蛋白检测仪定量后, 除菌分装, 4 °C 保存备用。

1.2.5 (hscFv₂₅)₂ 的活性的鉴定

1.2.5.1 细胞 ELISA 检测 (hscFv₂₅)₂ 相对亲和力和特异性 SMMC-7721 肝癌细胞及正常肝细胞 HL-02 铺 96 孔板, 经固定和封闭后, 以上述纯化产物(hscFv₂₅)₂ 为一抗(做倍比稀释, 最高终浓度为 20 mg/L), 以鼠抗 E-tag 抗体为二抗, 进行细胞 ELISA, 酶标仪测定 A_{492/630} 值, 达到饱和后的 A_{492/630} 值降低到 50% 时的抗体浓度为 (hscFv₂₅)₂ 的相对亲和力。以亲本单链抗体 hscFv₂₅-E-tag

为平行对照。

1.2.5.2 临床肝癌患者石蜡切片免疫组织化学染色 上述纯化的(hscFv₂₅)₂对60例临床确诊的肝癌、3例肝硬化及2例正常肝的石蜡切片进行常规免疫组织化学染色,显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 的构建 V_H 基因 PCR 扩增片段、Linker-V_L-E-tag PCR 基因扩增片段与 pTIG 表达载体大片段进行 3 片段连接,转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细菌,提取质粒。该质粒经 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切,可切出约 760 bp 大小的片段,与目的基因大小相符,后经序列测定证实序列与设计一致,说明重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 构建成功。

2.2 (hscFv₂₅)₂ 的诱导表达和纯化 将重组 pTIG(hscFv₂₅)₂ 表达载体转化的宿主菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导(以未诱导的同一菌株为对照)表达,碎菌上清进行的 12% SDS-PAGE 显示,约在 *M*_r 30 000 处出现 1 条新生蛋白带(图 1),与目的蛋白的大小相一致,表达量约占细

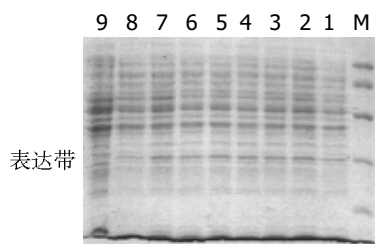


图1 重组(hscFv₂₅)₂表达产物的SDS-PAGE分析。M:蛋白标记物 *M*_r×10³: 97, 66, 43, 31 和 20; 1-8: 诱导表达不同时间的(hscFv₂₅)₂宿主菌碎菌上清。9: 未诱导表达(hscFv₂₅)₂宿主菌碎菌上清。

菌裂解上清总蛋白量的 8% 左右,说明是可溶性表达,可溶性表达产物经 Nie 柱(His 亲和层析柱)纯化,纯度达到电泳纯。可溶性表达产物经 Western blot 鉴定,证实为目的基因表达产物。

2.3 表达产物抗体活性的检测 细胞 ELISA 检测结果显示,所纯化的表达产物可与 SMMC-7721 肝癌细胞结合而与正常肝细胞 HL-02 不结合,Diabody 的相对亲和力约为 0.25 mg/L,而亲本单链抗体的相对亲和力约为 2.50 mg/L,即 Diabody 的相对亲和力提高了 10 倍左右。肝癌石蜡切片脱蜡、封闭后,加纯化产物 37 °C 作用 1 h,洗涤三次,加鼠抗 E-tag 抗体(1:2 000),37 °C 作用 1 h,洗涤三次,加 HRP 标记的兔抗鼠抗体,37 °C 作用 30 min 后显色,衬染封片后在显微镜下观察。结果显示,有 45 例为阳性,阳性率为 75%,抗原主要定位于肿瘤细胞膜上,少数病例细胞质或细胞核也呈阳性,癌旁肝、正常肝及肝硬化组织未见阳性着色(图 2),这于亲本单克隆抗体相一致,说明我们所制备的人源化抗肝癌(hscFv₂₅)₂ 较好地保持了亲本抗体的特异性,其相对亲和力比其亲本单链抗体大约高 10 倍。

3 讨论

我国是肝癌高发区,10 a 前的统计数字就显示,我国每年有 11 万人死于肝细胞肝癌,今年来虽未见明确的统计数字,但可以肯定的是其发病率还在呈上升趋势。对于肿瘤的治疗,基因工程抗体再次成为肿瘤诊断和治疗研究的热点。对于实体瘤的体内诊断和治疗,小分子抗体是比较理想的靶向载体,目前已有数株小分子抗体作为放射免疫诊断或治疗载体被批准上市,但尚无肝癌体内诊断性或治疗性抗体上市^[3]。在我国,目

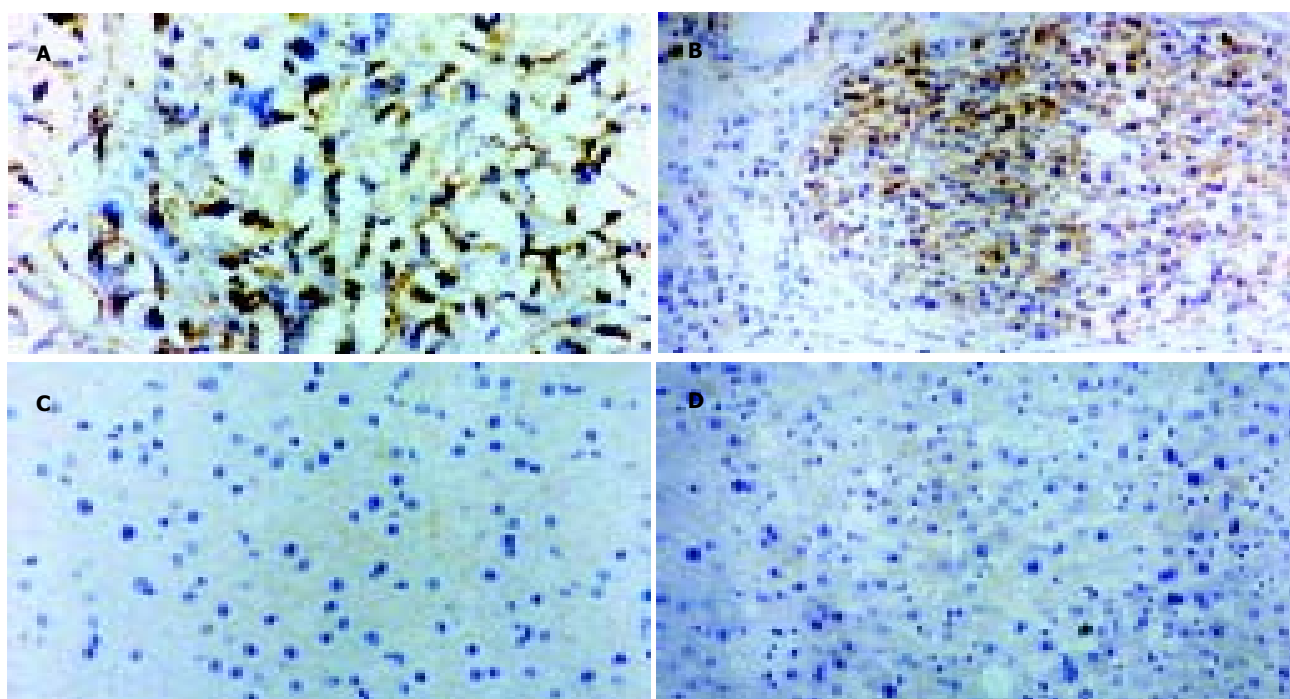


图2 重组表达产物 Diabody 对肝癌组织的免疫组织化学染色(×400)。A-B: Diabody 对肝癌组织的免疫组织化学染色; C: 正常肝的免疫组织化学染色; D: 肝再生结节的免疫组织化学染色。

前有一株同位素标记的,通过全抗体消化而制备的鼠源性抗肝癌抗体片段进入临床研究的报道,在国外还未见类似报道。Diabody具有穿透能力强、亲和力较高和半衰期较合适等特点,同时又具有基因操作简单,容易进行高效表达和大规模生产,因此是比较理想的放射免疫诊断或治疗载体^[2,4]。Diabody是单链抗体通过自然折叠而形成的二聚体形式,两条链间无共价键连接,但和单链抗体一样,轻重链可变区之间也需要连接肽连接,连接肽的长度以5-10个氨基酸为宜,多数报道为5肽,即GGGGS。连接肽长度不宜过长,否则活性蛋白会以单链抗体的形式存在,但也不宜过短,否则活性蛋白会以多聚体的形式存在(三价抗体活四价抗体)^[5-6]。

我们已经制备了一株抗肝癌人源化单链抗体,该抗体与肿瘤坏死因子 α 、PE38等基因融合表达的抗肝癌双功能抗体,对荷肝癌移植裸鼠具有一定的导向杀伤作用^[7],表明单链抗体具有良好的靶向性能,因此我们将该单链抗体改造成Diabody,为应用该型抗体进行临闯肝癌的放射免疫诊断或治疗奠定基础。

4 参考文献

- 1 Yazaki PJ, Wu AM, Tsai SW, Williams LE, Ikler DN, Wong JY, Shively JE, Raubitschek AA. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and T84.66 minibody: comparison to radiolabeled fragments. *Bioconjug Chem* 2001;12:220-228
- 2 张静,刘彦仿,杨守京,孙志伟,乔庆,张素珍. 抗肝癌单链抗体融合人突变型TNF α 的构建与表达. *世界华人消化杂志* 2000;8: 616-620
- 3 陈惠鹏. 医药生物工程进展. 北京: 人民军医出版社, 2004:89-108
- 4 Tahtis K, Lee FT, Smyth FE, Power BE, Renner C, Brechbiel M W, Old LJ, Hudson PJ, Scott AM. Biodistribution properties of (111)indium-labeled C-functionalized trans-cyclohexyl diethylenetriaminepenta acid humanized 3S193 diabody and F(ab')₂ constructs in a breast carcinoma xenograft model. *Clin Cancer Res* 2001;7:1061-1072
- 5 Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR, Hudson PJ. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Meth* 2001;248:47-66
- 6 Wu AM, Chen W, Raubitschek A, Williams LE, Neumaier M, Fischer R, Hu SZ, Odom-Maryon T, Wong JY, Shively JE. Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 1996;2:21-26
- 7 孙志伟,刘彦仿,袁清安,俞伟源,黄翠芬,马兰花,于继云. 抗肝癌人源化单链抗体融合肿瘤坏死因子 α 的导向作用. *中华肝脏病杂志* 2000;8:352-355

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

应用基因芯片技术筛查大肠癌相关基因

南清振,张振书,杨希山,肖冰,高蕾,叶方鹏,武金保

南清振,张振书,杨希山,肖冰,高蕾,叶方鹏,武金保,南方医科大学附属南方医院消化研究所 广东省广州市 510510
国家自然科学基金资助项目, No.39970825
项目负责人: 南清振, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医科大学附属南方医院消化研究所. nanqzh@fimmu.com
收稿日期: 2004-08-31 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 筛选与大肠癌相关的差异表达基因。

方法: 用包含8 000个cDNA的基因芯片法检测4例大肠高分化腺癌组织及其癌旁正常肠黏膜组织标本RNA表达谱, 通过对比分析寻找与大肠癌相关的基因。

结果: 大肠癌差异表达基因中有1 807个基因发生了显著性变化, 其中上调表达的基因有936个, 最有显著上调的有36个; 下调表达的基因有871个, 最有显著下调的有30个。

结论: 大肠癌的发生是一个多基因表达失调的过程, 大肠癌与癌旁正常肠黏膜组织间存在差异表达的基因。

南清振, 张振书, 杨希山, 肖冰, 高蕾, 叶方鹏, 武金保. 应用基因芯片技术筛查

大肠癌相关基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2742-2744
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2742.asp>

0 引言

随着人类基因组计划的开发研究和分子生物学、分子遗传学的迅速发展成熟, 人类对肿瘤的认识已进入分子水平^[1]。寻找大肠癌相关基因, 深入了解该相关基因在肿瘤发生及转移过程中的作用已成为可能。基因芯片技术适用于大规模的基因检测和基因功能的研究、疾病发生机制的研究及临床诊断等方面^[2-4]。本研究系选用有8000条人类基因的cDNA表达谱芯片, 以临床切除的大肠癌及癌旁正常肠黏膜组织标本为研究对象, 筛查大肠癌发生、发展过程中与肿瘤相关的基因, 为大肠癌的早期诊断与治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003年收治的4例大肠高分化腺癌患者组织标本和其对应癌旁5 cm以上的正常大肠黏膜组织。

前有一株同位素标记的,通过全抗体消化而制备的鼠源性抗肝癌抗体片段进入临床研究的报道,在国外还未见类似报道。Diabody具有穿透能力强、亲和力较高和半衰期较合适等特点,同时又具有基因操作简单,容易进行高效表达和大规模生产,因此是比较理想的放射免疫诊断或治疗载体^[2,4]。Diabody是单链抗体通过自然折叠而形成的二聚体形式,两条链间无共价键连接,但和单链抗体一样,轻重链可变区之间也需要连接肽连接,连接肽的长度以5-10个氨基酸为宜,多数报道为5肽,即GGGGS。连接肽长度不宜过长,否则活性蛋白会以单链抗体的形式存在,但也不宜过短,否则活性蛋白会以多聚体的形式存在(三价抗体活四价抗体)^[5-6]。

我们已经制备了一株抗肝癌人源化单链抗体,该抗体与肿瘤坏死因子 α 、PE38等基因融合表达的抗肝癌双功能抗体,对荷肝癌移植裸鼠具有一定的导向杀伤作用^[7],表明单链抗体具有良好的靶向性能,因此我们将该单链抗体改造成Diabody,为应用该型抗体进行肝癌的放射免疫诊断或治疗奠定基础。

4 参考文献

- 1 Yazaki PJ, Wu AM, Tsai SW, Williams LE, Ikler DN, Wong JY, Shively JE, Raubitschek AA. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and T84.66 minibody: comparison to radiolabeled fragments. *Bioconjug Chem* 2001;12:220-228
- 2 张静,刘彦仿,杨守京,孙志伟,乔庆,张素珍. 抗肝癌单链抗体融合人突变型TNF α 的构建与表达. *世界华人消化杂志* 2000;8: 616-620
- 3 陈惠鹏. 医药生物工程进展. 北京: 人民军医出版社, 2004:89-108
- 4 Tahtis K, Lee FT, Smyth FE, Power BE, Renner C, Brechbiel M W, Old LJ, Hudson PJ, Scott AM. Biodistribution properties of (111)indium-labeled C-functionalized trans-cyclohexyl diethylenetriaminepenta acid humanized 3S193 diabody and F(ab')₂ constructs in a breast carcinoma xenograft model. *Clin Cancer Res* 2001;7:1061-1072
- 5 Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR, Hudson PJ. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Meth* 2001;248:47-66
- 6 Wu AM, Chen W, Raubitschek A, Williams LE, Neumaier M, Fischer R, Hu SZ, Odom-Maryon T, Wong JY, Shively JE. Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 1996;2:21-26
- 7 孙志伟,刘彦仿,袁清安,俞伟源,黄翠芬,马兰花,于继云. 抗肝癌人源化单链抗体融合肿瘤坏死因子 α 的导向作用. *中华肝脏病杂志* 2000;8:352-355

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

应用基因芯片技术筛查大肠癌相关基因

南清振,张振书,杨希山,肖冰,高蕾,叶方鹏,武金保

南清振,张振书,杨希山,肖冰,高蕾,叶方鹏,武金保,南方医科大学附属南方医院消化研究所 广东省广州市 510510
国家自然科学基金资助项目, No.39970825
项目负责人: 南清振, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医科大学附属南方医院消化研究所. nanqzh@fimmu.com
收稿日期: 2004-08-31 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 筛选与大肠癌相关的差异表达基因。

方法: 用包含8 000个cDNA的基因芯片法检测4例大肠高分化腺癌组织及其癌旁正常肠黏膜组织标本RNA表达谱, 通过对比分析寻找与大肠癌相关的基因。

结果: 大肠癌差异表达基因中有1 807个基因发生了显著性变化, 其中上调表达的基因有936个, 最有显著上调的有36个; 下调表达的基因有871个, 最有显著下调的有30个。

结论: 大肠癌的发生是一个多基因表达失调的过程, 大肠癌与癌旁正常肠黏膜组织间存在差异表达的基因。

南清振, 张振书, 杨希山, 肖冰, 高蕾, 叶方鹏, 武金保. 应用基因芯片技术筛查

大肠癌相关基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2742-2744
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2742.asp>

0 引言

随着人类基因组计划的开发研究和分子生物学、分子遗传学的迅速发展成熟, 人类对肿瘤的认识已进入分子水平^[1]。寻找大肠癌相关基因, 深入了解该相关基因在肿瘤发生及转移过程中的作用已成为可能。基因芯片技术适用于大规模的基因检测和基因功能的研究、疾病发生机制的研究及临床诊断等方面^[2-4]。本研究系选用有8000条人类基因的cDNA表达谱芯片, 以临床切除的大肠癌及癌旁正常肠黏膜组织标本为研究对象, 筛查大肠癌发生、发展过程中与肿瘤相关的基因, 为大肠癌的早期诊断与治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003年收治的4例大肠高分化腺癌患者组织标本和其对应癌旁5 cm以上的正常大肠黏膜组织。

标本切除后立即置于液氮,冻存备用。TRIzol试剂购自Life Technologies公司,dNTP购自Promega公司;Taq酶购自上海生物工程服务公司;逆转录酶及缓冲液购自Gibco公司;荧光素3标记的脱氧尿嘧啶三磷酸(Cy3 dUTP)、荧光素标记的5脱氧尿嘧啶三磷酸(Cy5 dUTP)购自美国Amersham Pharmacia公司;总RNA提取试剂盒购自德国Qiagen公司。芯片类型(微芯公司基因表达谱芯片CSC-GE-80),Gen III Microarray Spotter芯片点样仪购自Amersham Pharmacia公司;恒温杂交箱购自Shellab公司;芯片扫描仪购自Amersham Pharmacia公司;聚合酶链反应(PCR)仪购自MJ Research公司;扫描图像显示用软件为ImageQuant (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd);扫描图像分析用软件为ArrayVision (Imaging Research, Ltd)。芯片实验数据分析软件为MIDAS(Chipscreen Biosciences, Ltd)。

1.2 方法 按一步法抽提、纯化大肠癌及正常大肠组织的总RNA。用无RNA酶的三蒸水溶解沉淀,紫外分光分析及电泳检测显示,获得高质量的总RNA。参照Draghici *et al*^[9]方法进行逆转录标记cDNA探针并纯化。在链合成中掺入荧光素标记的dUTP,用Cy3 dUTP标记正常组织mRNA,用Cy5 dUTP标记大肠癌组织mRNA。检测标记的荧光含量。用分光光度计检测260 nm, 550 nm, 650 nm时的A值,然后计算出荧光含量。将标记好的探针(Cy3/Cy5)按等量混匀,溶解在30 μ L的杂交缓冲液中。将芯片和杂交混合探针分别置于95 $^{\circ}$ C双蒸水浴中变性5 min,立即将混合探针加在芯片上,封片(不能留有气泡),置杂交舱,密闭,42 $^{\circ}$ C孵箱恒温杂交16 h,洗片,晾干。玻片完全干燥后,放入扫描片夹中,利用扫描仪进行扫描;扫描后将图像转化为基于荧光强度的数字信号,随后进行数据分析和处理。用以下3个条件作为判定基因差异表达的标准:(1)Cy3和Cy5信号的比值相差2倍(上调Cy3/Cy5 >2.0或下调<0.5)以上;(2)Cy3或Cy5, Cy3和Cy5信号值其中之一必须>600;(3)聚合酶链反应实验结果良好。同时要求筛选出的内对照基因表达数据在所有标本中重复^[6-9]。

2 结果

大肠癌组织 A_{260}/A_{280} 值达1.85,而癌旁正常肠黏膜组织的 A_{260}/A_{280} 值1.96,电泳结果证实高纯化的总RNA。部分基因芯片杂交结果及所有基因点CY3/CY5信号强度散点图(图1, 2)。用微矩阵基因芯片筛选4例大肠癌和癌旁正常肠黏膜组织的差异表达的基因,按照我们的数据筛选标准,芯片结果中有1 807个基因发生了显著性变化,其中上调表达的基因有936个,最有显著性上调的有36个;下调表达的基因有871个,最有显著性下调的有30个。筛选出的有显著差异性的基因按照功能进行分类可以发现他们涉及到细胞生长的各个方面,包括细胞增生,细胞凋亡,细胞代谢以及细胞骨架结构,同时还涉及到各种原癌基因和肿瘤抑制基因的表达

变化。这反映了肿瘤生长过程涉及到各方面的基因表达变化。

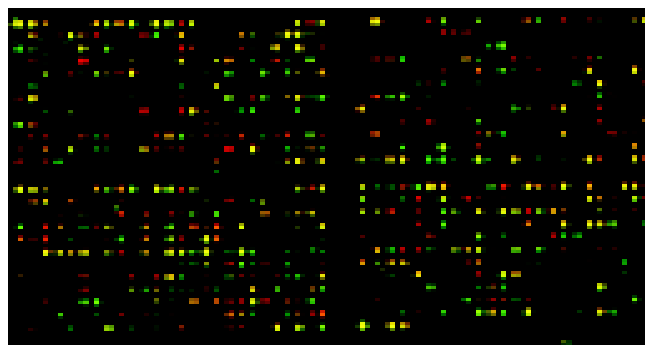


图1 部分基因芯片杂交双色荧光标记叠加图。Cy3标记正常大肠黏膜的总RNA作为对照组,Cy5标记大肠癌的总RNA作为实验组,分别与芯片杂交后进行双色荧光叠加。对于某一点的两种叠加荧光信号,如果Cy3信号较强,该点多显示绿色(下调);如果Cy5信号较强,该点多显示红色(上调);如果强度相似,即显示黄色。

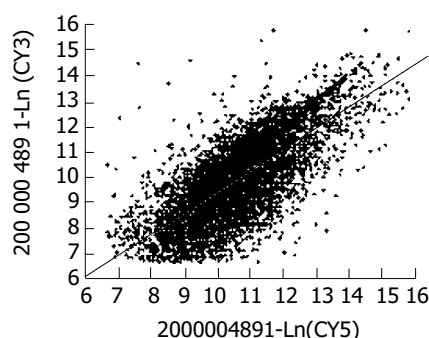


图2 所有基因点CY3/CY5杂交信号强度散点图。X轴、Y轴分别以Cy3荧光强度值和Cy5荧光强度值为坐标,每一个数据点代表芯片上一个基因杂交信号。

3 讨论

我们采用的微矩阵基因芯片是以微芯基因科技公司的8 000条基因为靶基因,制备成cDNA芯片,以临床切除的大肠癌及正常大肠黏膜标本为研究对象,对这两种组织总RNA逆转录产生的cDNA进行杂交检测,寻找和筛查大肠癌相关基因,探讨大肠癌在发生、发展过程中各种基因的表达变化,为大肠癌的早期诊治提供理论依据。软件统计分析微矩阵扫描结果提示,大肠癌发生中有众多基因发生了分子生物学改变(个体差异存在不同),其中有1 807个基因发生了显著性变化,上调表达的基因有936个,最有显著性上调的有36个;下调表达的基因有871个,最有显著性下调的有30个。而且发现在大肠癌的发生、发展中有多种基因的参与,他们涉及到细胞生长的各个方面,包括细胞增生,细胞凋亡,细胞代谢以及细胞骨架结构,同时还涉及到各种原癌基因和肿瘤抑制基因的表达变化。证实大肠癌中基因改变的多样性,进一步推断肿瘤的发生、发展是一多基因、多阶段过程^[10-12]。

由于肿瘤部位所包含的细胞类型的多样性,使得人们在解释这些相关基因的表达变化与肿瘤中特定细

胞类型的表型变化的相关性时遇到一定的困难.但是对于那些有非常明显变化的基因和主要的细胞类型间的相关性仍然可以在进一步的研究中得到明确^[13-15].我们按照相关的功能挑选了部分基因可以看出一些与肿瘤相关的基因表达变化,如细胞凋亡相关基因的下调表达,但是同时也注意到一些细胞凋亡启动基因的表达上调,这其中可能反映了肿瘤对抗细胞凋亡的内在机制^[16-17];而在原癌基因方面,大部分发生了表达上调,但是也有部分表达下调,这可能与不同原癌基因在不同肿瘤发生中的作用不同有关;其他如细胞骨架蛋白相关基因的表达变化则与肿瘤细胞的生长和转移特性密切相关^[18].

4 参考文献

- 1 南清振,高蕾,杨希山,肖冰,周京旭,张亚历,施理. mRNA差异显示法筛选大肠癌相关基因. 第一军医大学学报 2001;21:258-261
- 2 纪冬,成军,刘妍,王建军,郭江. 应用基因表达谱芯片技术筛选NS3TP1转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12:1707-1711
- 3 岑辉,唐小萍,韩英,曾晓,吴岚军,方永明. 低密度基因芯片的性能与应用. 中国医学检验杂志 2004;5:8-11
- 4 Man XB, Tang L, Qiu XH, Yang LQ, Cao HF, Wu MC, Wang HY. Expression of cytochrome P450E1 gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1565-1568
- 5 Draghici S, Kulaeva O, Hoff B, Petrov A, Shams S, Tainsky MA. Noise sampling method: an ANOVA approach allowing robust selection of differentially regulated genes measured by DNA microarrays. *Bioinformatics* 2003;19:1348-1359
- 6 Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* 2002;3:research0062
- 7 成军,刘妍,洪源,王建军,杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白3反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 8 刘妍,成军,王春花,杨倩,王建军,纪冬. 基因表达谱芯片技术筛选XTP4基因转染细胞差异表达基因. 胃肠病学和肝病学杂志 2004;13:209-213
- 9 Li SR, Dorudi S, Bustin SA. Identification of differentially expressed genes associated with colorectal cancer liver metastasis. *Eur Surg Res* 2003;35:327-336
- 10 盛剑秋,晨智敏. 大肠癌相关基因对大肠癌的筛选. 世界华人消化杂志 2001;9:783-785
- 11 潘胜武,孙安乐,刘变英,崔大祥,闫小君,栗彤,雷宇锋,王胜. 大肠癌相关基因表达的早期诊断意义. 世界华人消化杂志 2000;8:1431-1432
- 12 Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, Orntoft TF. Classification of Dukes'B and C colorectal cancers using expression arrays. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:263-271
- 13 陈尧,周总光. 基因表达谱芯片在筛选直肠癌转移相关基因中的应用. 中华胃肠外科杂志 2004;7:137-139
- 14 Gupta V, Cherkassky A, Chatis P, Joseph R, Johnson AL, Broadbent J, Erickson T, DiMeo J. Directly labeled mRNA produces highly precise and unbiased differential gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e13
- 15 Skubitz KM, Skubitz AP. Gene expression in aggressive fibromatosis. *J Lab Clin Med* 2004;143:89-98
- 16 Kluger HM, Kluger Y, Gilmore-Hebert M, DiVito K, Chang JT, Rodov S, Mironenko O, Kacinski BM, Perkins AS, Sapi E. cDNA microarray analysis of invasive and tumorigenic phenotypes in a breast cancer model. *Lab Invest* 2004;84:320-331
- 17 Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 2003;9:931-946
- 18 Ognjanovic S, Tashima LS, Bryant-Greenwood GD. The effects of pre-B-cell colony-enhancing factor on the human fetal membranes by microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:1187-1195

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

慢性萎缩性胃炎患者血清骨桥蛋白的变化

邢晓静, 官月华, 袁媛

邢晓静, 官月华, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001
国家“十五”科技攻关项目资助, No. 2001BA703B06(B)
项目负责人: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路 92 号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室. yyuan@mail.com.edc.cn
电话: 024-23256666-6153
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-08-30

摘要

目的: 探讨血清骨桥蛋白(osteopontin, OPN)水平与慢性萎

缩性胃炎之间的关系。

方法: 慢性萎缩性胃炎患者 42 名, 正常人 38 名, 胃癌患者 42 例应用酶联免疫技术(ELISA 法)检测血清 OPN 表达情况。

结果: 慢性萎缩性胃炎患者血清 OPN 水平($25.0 \pm 2.8 \mu\text{g/L}$) 低于正常人($41.4 \pm 7.5 \mu\text{g/L}$), 低于胃癌患者血清 OPN 水

胞类型的表型变化的相关性时遇到一定的困难.但是对于那些有非常明显变化的基因和主要的细胞类型间的相关性仍然可以在进一步的研究中得到明确^[13-15].我们按照相关的功能挑选了部分基因可以看出一些与肿瘤相关的基因表达变化,如细胞凋亡相关基因的下调表达,但是同时也注意到一些细胞凋亡启动基因的表达上调,这其中可能反映了肿瘤对抗细胞凋亡的内在机制^[16-17];而在原癌基因方面,大部分发生了表达上调,但是也有部分表达下调,这可能与不同原癌基因在不同肿瘤发生中的作用不同有关;其他如细胞骨架蛋白相关基因的表达变化则与肿瘤细胞的生长和转移特性密切相关^[18].

4 参考文献

- 1 南清振,高蕾,杨希山,肖冰,周京旭,张亚历,施理. mRNA差异显示法筛选大肠癌相关基因. 第一军医大学学报 2001;21:258-261
- 2 纪冬,成军,刘妍,王建军,郭江. 应用基因表达谱芯片技术筛选NS3TP1转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12:1707-1711
- 3 岑辉,唐小萍,韩英,曾晓,吴岚军,方永明. 低密度基因芯片的性能与应用. 中国医学检验杂志 2004;5:8-11
- 4 Man XB, Tang L, Qiu XH, Yang LQ, Cao HF, Wu MC, Wang HY. Expression of cytochrome P4502E1 gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1565-1568
- 5 Draghici S, Kulaeva O, Hoff B, Petrov A, Shams S, Tainsky MA. Noise sampling method: an ANOVA approach allowing robust selection of differentially regulated genes measured by DNA microarrays. *Bioinformatics* 2003;19:1348-1359
- 6 Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* 2002;3:research0062
- 7 成军,刘妍,洪源,王建军,杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白3反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 8 刘妍,成军,王春花,杨倩,王建军,纪冬. 基因表达谱芯片技术筛选XTP4基因转染细胞差异表达基因. 胃肠病学和肝病学杂志 2004;13:209-213
- 9 Li SR, Dorudi S, Bustin SA. Identification of differentially expressed genes associated with colorectal cancer liver metastasis. *Eur Surg Res* 2003;35:327-336
- 10 盛剑秋,晨智敏. 大肠癌相关基因对大肠癌的筛选. 世界华人消化杂志 2001;9:783-785
- 11 潘胜武,孙安乐,刘变英,崔大祥,闫小君,栗彤,雷宇锋,王胜. 大肠癌相关基因表达的早期诊断意义. 世界华人消化杂志 2000;8:1431-1432
- 12 Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, Orntoft TF. Classification of Dukes'B and C colorectal cancers using expression arrays. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:263-271
- 13 陈尧,周总光. 基因表达谱芯片在筛选直肠癌转移相关基因中的应用. 中华胃肠外科杂志 2004;7:137-139
- 14 Gupta V, Cherkassky A, Chatis P, Joseph R, Johnson AL, Broadbent J, Erickson T, DiMeo J. Directly labeled mRNA produces highly precise and unbiased differential gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e13
- 15 Skubitz KM, Skubitz AP. Gene expression in aggressive fibromatosis. *J Lab Clin Med* 2004;143:89-98
- 16 Kluger HM, Kluger Y, Gilmore-Hebert M, DiVito K, Chang JT, Rodov S, Mironenko O, Kacinski BM, Perkins AS, Sapi E. cDNA microarray analysis of invasive and tumorigenic phenotypes in a breast cancer model. *Lab Invest* 2004;84:320-331
- 17 Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 2003;9:931-946
- 18 Ognjanovic S, Tashima LS, Bryant-Greenwood GD. The effects of pre-B-cell colony-enhancing factor on the human fetal membranes by microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:1187-1195

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

慢性萎缩性胃炎患者血清骨桥蛋白的变化

邢晓静, 官月华, 袁媛

邢晓静, 官月华, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001
国家“十五”科技攻关项目资助, No. 2001BA703B06(B)
项目负责人: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路 92 号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室. yyuan@mail.com.edc.cn
电话: 024-23256666-6153
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-08-30

摘要

目的: 探讨血清骨桥蛋白(osteopontin, OPN)水平与慢性萎

缩性胃炎之间的关系。

方法: 慢性萎缩性胃炎患者 42 名, 正常人 38 名, 胃癌患者 42 例应用酶联免疫技术(ELISA 法)检测血清 OPN 表达情况。

结果: 慢性萎缩性胃炎患者血清 OPN 水平($25.0 \pm 2.8 \mu\text{g/L}$) 低于正常人($41.4 \pm 7.5 \mu\text{g/L}$), 低于胃癌患者血清 OPN 水

平($78.9 \pm 44.5 \mu\text{g/L}$), 三者相比差异均有统计学意义($P < 0.01$). 血清OPN水平与慢性萎缩性胃炎患者的性别、年龄无相关性($P > 0.05$).

结论: 慢性萎缩性胃炎患者血清OPN明显下降.

邢晓静, 宫月华, 袁媛. 慢性萎缩性胃炎患者血清骨桥蛋白的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2744-2746
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2744.asp>

0 引言

慢性萎缩性胃炎指慢性胃膜炎性病变累及胃膜腺体萎缩. 作为在胃癌演变中一个最重要的癌前疾病与胃癌的发生关系密切, 是胃癌的病变基础. 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种有多种功能的分泌型钙结合磷酸化糖蛋白. 可由多种细胞分泌, 普遍认为 OPN 与肿瘤的发生, 发展关系密切, 能够促进肿瘤的浸润转移, 反映肿瘤的恶性程度. 而近来亦有不同意见认为, OPN 与肿瘤的发生相关而非转移相关. 肿瘤的防治是当前医学迫切需要解决的问题, 癌前疾病的早期发现对肿瘤的防治意义重大, 寻求新的有意义的筛查指标是其中的重要研究方向. 目前, 尚无 OPN 与萎缩性胃炎关系的报道.

我们检测血清 OPN 在正常人、慢性萎缩性胃炎和胃癌患者中的表达情况, 探讨血清中 OPN 水平与慢性萎缩性胃炎之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 辽宁省庄河地区正常人 38 名, 男 18 名, 女 20 名, 年龄 34-79(平均 51 岁); 慢性萎缩性胃炎患者 42 例, 男 21 例, 女 21 例, 年龄 24-72(平均 54 岁); 胃癌患者 42 例来自中国医科大学附属第一医院肿瘤科、中国医科大学附属第二医院普外科: 男 23 例, 女 19 例, 年龄 36-78(平均 57 岁), 全部病例均经病理诊断确诊, 均为未经治疗患者. 采集受试对象空腹外周静脉血, 分离血清, -80°C 放置备用.

1.2 方法 应用血清 OPN 抗体 ELISA 检测试剂盒(美国 Assay Disigns 公司)检测血清 OPN 水平. 全部操作均严格按照试剂盒操作说明书进行, 应用 Multiskan Ascent 自动酶标仪(芬兰 Labsystems 公司)空白孔调零, 在 450 nm 波长下读取吸光度值, 根据标准曲线得出 OPN 浓度. 实验中所有样品及标准品均双份检测.

统计学处理 采用 t 检验及(s)方差分析, 应用统计软件 SPSS10.0 处理.

2 结果

慢性萎缩性胃炎患者血清 OPN 浓度平均为 $25.0 \pm 2.8 \mu\text{g/L}$, 正常人为 $41.4 \pm 7.5 \mu\text{g/L}$, 胃癌患者为 $78.9 \pm 44.5 \mu\text{g/L}$. 慢性萎缩性胃炎患者血清 OPN 显著低于正常人及胃癌患者($P < 0.01$). 慢性萎缩性胃炎患者性别、年龄与血清 OPN 表达无相关性($P > 0.05$, 图 1).

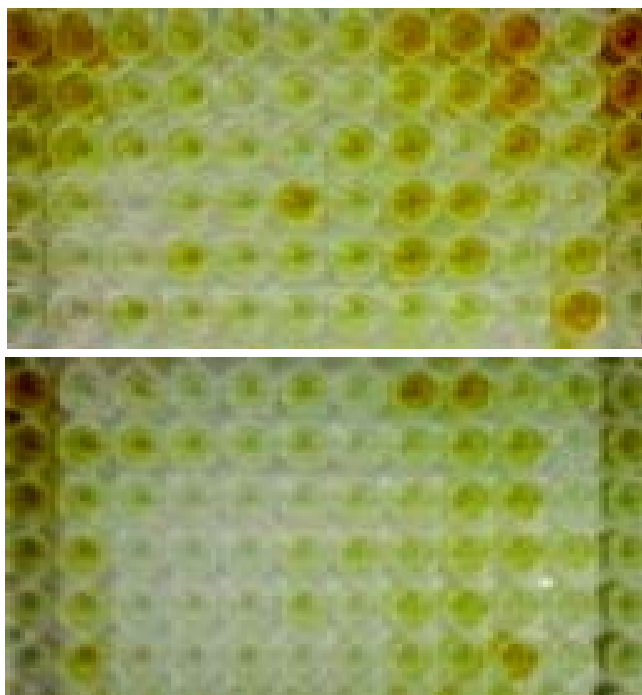


图1 骨桥蛋白 ELISA 检测. 无色或极浅色者为阴性, 棕黄色为阳性.

3 讨论

慢性萎缩性胃炎作为慢性胃炎的一种, 因其与胃癌的发生关系密切, 较其他疾病发生胃癌的频率高, 是胃癌的病变基础, 为胃癌的癌前疾病, 受到较多关注. 流行病学资料表明胃癌高发区慢性萎缩性胃炎的发病率明显高于低发区^[1-4]. OPN 是一种有多种功能的分泌型糖蛋白, 在体内以游离状态和结合状态两种形式存在, 在多种体液中均可检测得到. OPN 含多个酪氨酸蛋白激酶介导的磷酸化部位和糖基化部位, 多种激酶对 OPN 发生磷酸化的部位不同是其发挥不同的功能的原因之一. OPN 作为多功能蛋白质, 对肿瘤生长的诸多方面均有影响, 参与细胞的信号传导; 参与细胞外基质的迁移和体外形成毛细血管样管道, 抑制 p53 活性, 影响机体非特异性应答^[5-13]. Chang *et al*^[14]报道, 体外由 TPA 诱发的癌性生长可被 OPN 抗体所抑制, 其认为体外诱导中 OPN 必不可少. Takahashi *et al*^[15]报道成纤维母细胞瘤的 OPN 转染体在老鼠体内可显著诱导新血管生成. Terashi *et al*^[16]认为 OPN 水平的低表达与肝胆管癌的进展和临床结论相关. OPN 参与癌基因对细胞的转染, 同时抑制抑癌基因活性, 抑制增生细胞凋亡从而发挥其作为增生细胞标志蛋白的作用^[17]等. 我们在慢性萎缩性胃炎患者组中, 血清 OPN 水平明显低于正常人组和胃癌患者组($P < 0.01$), 可能是在慢性萎缩性胃炎中, 其胃黏膜层变薄, 胃黏膜内固有腺管萎缩, 黏膜表面上皮细胞及胃小凹上皮细胞脱落, 从而 OPN 分泌减少, 分泌入血清的 OPN 同样减少, 导致在慢性萎缩性胃炎患者中表达下降, 血清 OPN 值降低.

当前, 肿瘤的防治仍是医学界迫切需要解决的问题. 对人群进行有计划的、定期的普查, 不仅可以及

时发现已患肿瘤的患者,为早治提供有利的条件,而且可以及早查出癌前疾病(病变)的患者并予以适当的处置,这对预防癌症的发生、发展有着重要的意义。因此,寻求新的、有意义的监测指标意义重大。Van Heek *et al*^[18]以 Affymetrix 人类基因组 U133 标记基因分析 235 例基因片段,认为血清 OPN 测定优于基因片段分析,血清 OPN 测定可作为恶性疾病筛查指标之一。本实验发现血清 OPN 水平在胃良、恶疾病以及正常人群之间存在明显的差异,结果提示血清 OPN 水平可能对慢性萎缩性胃炎有预警作用,血清 OPN 水平降低的人群可能是慢性萎缩性胃炎的高发人群。血清 OPN 水平可作为鉴别胃癌及癌前疾病的良好的标志物。今后有必要进一步扩大样本例数及癌前疾病的种类,进行更深入研究。

4 参考文献

- 1 Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, Uwaifo AO, Otegbayo JA, Ola SO, Coker AO. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol* 2004;10:1958-1960
- 2 Yang GF, Deng CS, Xiong YY, Gong LL, Wang BC, Luo J. Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: Association with *Helicobacter pylori* cagA (+) infection. *World J Gastroenterol* 2004;10:491-496
- 3 Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD. Anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *H pylori* infection in patients with precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2003;9:755-758
- 4 Yin GY, Zhang WN, Shen XJ, Chen Y, He XF. Ultrastructure and molecular biological changes of chronic gastritis, gastric cancer and gastric precancerous lesions: a comparative study. *World J Gastroenterol* 2003;9:851-857
- 5 Gao C, Guo H, Downey L, Marroquin C, Wei J, Kuo PC. Osteopontin-dependent CD44v6 expression and cell adhesion in HepG2 cells. *Carcinogenesis* 2003;24:1871-1878
- 6 Gao C, Guo H, Wei J, Kuo PC. Osteopontin inhibits expression of cytochrome c oxidase in RAW 264.7 murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:120-125
- 7 Zhang GX, Zhao ZQ, Wang HD, Hao B. Enhancement of osteopontin expression in HepG2 cells by epidermal growth factor via phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *World J Gastroenterol* 2004;10:205-208
- 8 Mangum J, Bermudez E, Sar M, Everitt J. Related Articles, Links Osteopontin expression in particle-induced lung disease. *Exp Lung Res* 2004;30:585-598
- 9 Gao C, Mi Z, Guo H, Wei J, Wai PY, Kuo PC. Related Articles, Links A transcriptional repressor of osteopontin expression in the 4T1 murine breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:1010-1016
- 10 Mi Z, Guo H, Wai PY, Gao C, Wei J, Kuo PC. Related Articles, Links Differential osteopontin expression in phenotypically distinct subclones of murine breast cancer cells mediates metastatic behavior. *J Biol Chem* 2004;279:46659-46667
- 11 Marroquin CE, Downey L, Guo H, Kuo PC. Related Articles, Links Osteopontin increases CD44 expression and cell adhesion in RAW 264.7 murine leukemia cells. *Immunol Lett* 2004;95:109-112
- 12 Iguchi S, Nishi S, Ikegame M, Hoshi K, Yoshizawa T, Kawashima H, Arakawa M, Ozawa H, Gejyo F. Related Articles, Links Expression of osteopontin in cisplatin-induced tubular injury. *Nephron Exp Nephrol* 2004;97:96-105
- 13 Nagatomo T, Ohga S, Takada H, Nomura A, Hikino S, Imura M, Ohshima K, Hara T. Related Articles, Links Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. *Clin Exp Immunol* 2004;138:47-53
- 14 Chang PL, Cao M, Hicks P. Osteopontin induction is required for tumor promoter-induced transformation of preneoplastic mouse cells. *Carcinogenesis* 2003;24:1749-1758
- 15 Takahashi F, Akutagawa S, Fukumoto H, Tsukiyama S, Ohe Y, Takahashi K, Fukuchi Y, Saijo N, Nishio K. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice. *Int J Cancer* 2002;98:707-712
- 16 Terashi T, Aishima S, Taguchi K, Asayama Y, Sugimachi K, Matsuura S, Shimada M, Maehara S, Maehara Y, Tsuneyoshi M. Decreased expression of osteopontin is related to tumor aggressiveness and clinical outcome of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Liver Int* 2004;24:38-45
- 17 Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of Osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:723-749
- 18 Van Heek NT, Maitra A, Koopmann J, Fedarko N, Jain A, Rahman A, Iacobuzio-Donahue CA, Adsay V, Ashfaq R, Yeo CJ, Cameron JL, Offerhaus JA, Hruban RH, Berg KD, Goggins M. Gene expression profiling identifies markers of ampullary adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 2004;3:651-656

乌斯他丁对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用

李旭, 石力, 赵碧, 田伏洲, 黄大熔

李旭, 石力, 田伏洲, 黄大熔, 成都军区总医院全军普外中心
四川省成都市 610083
赵碧, 成都军区总医院临床实验科 四川省成都市 610083
项目负责人: 田伏洲, 610083, 四川省成都市, 成都军区总医院全军普外中心, lishi@mail.sc.cninfo.net
收稿日期: 2004-07-28 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 观察乌斯他丁(ulinastatin, UTI)对急性胰腺炎大鼠肝脏核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的抑制及其对肝损伤的损伤保护作用。

方法: Wistar 大鼠 72 只, 随机分为: 急性胰腺炎组(AP), 急性胰腺炎UTI治疗组(APU)和假手术组(SO). 分别于术后 3, 6, 12, 24 h 检测肝组织中 NF- κ B 活性、血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平。

结果: SO 组术后未见 NF- κ B 活化, 血浆 ALT 及肝脏病理无显著变化. 与 SO 组相比, AP 组术后 3, 6 h NF- κ B 活性(积分灰度)显著增加(3.13 ± 0.57 vs 0.71 ± 0.10 , 1.92 ± 0.26 vs 0.67 ± 0.11 , $P < 0.01$), 血浆 ALT 在 3-24 h 也显著高于 SO 组(1.1 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.09 , 1.6 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.1 , 2.4 ± 0.4 vs 0.7 ± 0.09 , 3.5 ± 0.7 vs 0.8 ± 0.1 , $P < 0.01$). APU 组 NF- κ B 活性在 3, 6 h 后显著低于 AP 组(2.26 ± 0.41 vs 3.13 ± 0.57 , 1.56 ± 0.23 vs 1.92 ± 0.26 , $P < 0.01$), 血浆 ALT 较 AP 组在 6, 12, 24 h 后也有了显著下降(1.2 ± 0.2 vs 1.6 ± 0.2 , 1.8 ± 0.3 vs 2.4 ± 0.4 , 2.5 ± 0.5 vs 3.5 ± 0.7 , $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$).

结论: UTI 能够抑制 NF- κ B 活化, 对急性胰腺炎大鼠肝损伤具有保护作用。

李旭, 石力, 赵碧, 田伏洲, 黄大熔. 乌斯他丁对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2747-2749
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2747.asp>

0 引言

急性胰腺炎肝损伤发生过程中, 有着许多炎症因子的参与^[1-2]. 而核因子 κ B 则是一类主要参与机体炎性分子表达调控的转录因子^[3-5], 他参与了急性胰腺炎肝损伤发生过程^[6]. 我们观察了大鼠急性胰腺炎发生时, 乌斯他丁(UTI)对 NF- κ B 活化的抑制作用以及由此而产生的对肝损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠 72 只, 雌雄不限, 体质量 200-250 g, 随机分为 3 组: (1)急性胰腺炎组(AP 组, 24 只);

用 3 g/L 戊巴比妥钠 ip 麻醉(10 mL/kg), 上腹部正中切口入腹, 经十二指肠穿刺胆管成功后, 以无创血管夹阻断肝门部胆管, 向胰管内逆行注入 50 g/L 牛磺胆酸钠(1 mL/kg), 注射完毕后松开血管夹, 关腹, 皮下注射生理盐水 2 mL, 以补充术中丢失水分. (2)急性胰腺炎 UTI 治疗组(APU 组, 24 只): 诱导胰腺炎前 1 h ip UTI (10 万 u/kg). (3)假手术组(SO 组, 24 只): 操作方法同 1, 但不向胰管内注入牛磺胆酸钠. 各组分别在术后 3, 6, 12, 24 h 再次开腹, 经下腔静脉采血约 5 mL, 置于肝素钠抗凝瓶中, 离心(2 000 r/min, 1 min), 取上清冻存; 并取大小约 0.5 cm³ 肝中叶组织二块, 一块浸泡于 40 g/L 多聚甲醛中, 另一块置于液氮中保存。

1.2 方法

1.2.1 肝组织 NF- κ B 活性 参照文献介绍的方法对肝组织进行核蛋白提取, 并用考马斯亮蓝测定蛋白浓度, 调蛋白浓度为 0.5 μ g/L 后置于 -70 $^{\circ}$ C 保存. 以 γ -³²P 在 T₄ 激酶的作用下标记 NF- κ B 探针, 探针序列为 5' -AGT GAGGGGACTTTCCAGGC-3'. 将标记的探针同肝组织核蛋白进行结合后, 置于非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳并进行放射自显影, 用凝胶扫描分析仪对显影结果进行分析, 以积分灰度值表示 NF- κ B 的活性变化。

1.2.2 血浆丙氨酸氨基转移酶 用自动生化分析仪(Beckman CX7)进行 ALT 检测。

统计学处理 结果以 mean \pm SD 表示, 组间行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著意义; $P < 0.01$ 为差异有极显著意义。

2 结果

2.1 肝组织 NF- κ B 活性 除 SO 组外, 其余 2 组在术后 3 h, 肝组织中 NF- κ B 存在显著活化, 6 h 后活化程度下降, 但仍显著高于 SO 组($P < 0.01$), 术后 12 h NF- κ B 活化程度则明显下降, 同 SO 组相比无显著差异($P > 0.05$), 至 24 h 活化消失. 其中 AP 组 NF- κ B 活化程度在 3-6 h 均显著高于 APU 组($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 急性胰腺炎大鼠肝组织 NF- κ B 活性的积分灰度值(mean \pm SD, $n = 24$)

分组	<i>t</i> (术后) / h		
	3	6	12
AP	3.13 ± 0.57	1.92 ± 0.26	0.8 ± 0.12
APU	2.26 ± 0.41^b	1.56 ± 0.23^b	0.75 ± 0.10
SO	0.71 ± 0.10	0.67 ± 0.11	0.69 ± 0.11

^b $P < 0.01$ vs AP, SO 组。

2.2 血浆 ALT SO 组 ALT 术后无明显变化 AP 及 APU 组 ALT 在术后 3–24 h 均呈持续性上升, 显著高于 SO 组 ($P < 0.01$). 但 6 h 后 APU 组 ALT 明显低于 AP 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 2).

表 2 急性胰腺炎大鼠血浆 ALT (mean \pm SD, $n = 24$, kat/L)

分组	t (术后)/h			
	3	6	12	24
AP	1.1 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	2.4 \pm 0.4	3.5 \pm 0.7
APU	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2 ^a	1.8 \pm 0.3 ^d	2.5 \pm 0.5 ^d
SO	0.7 \pm 0.09 ^b	0.7 \pm 0.1 ^b	0.7 \pm 0.09 ^b	0.8 \pm 0.1 ^b

^b $P < 0.01$ vs AP 和 APU 组; ^a $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ s AP 组.

3 讨论

急性胰腺炎常合并全身多脏器功能损害, 而肝脏则是最常受累的器官之一, 急性胰腺炎所引起的肝损害不但可以加重胰腺炎病情, 肝功能的好坏还直接关系到其他脏器并发症的出现与否. 核因子 κ B 是一类能与某些基因启动子及增强子区的 κ B 序列结合的蛋白质, 他能启动或增强这些基因的转录^[7–9]. 在静息的细胞中, NF- κ B 以无活性的形式存在于细胞质之中, 当受到一定的刺激后, NF- κ B 发生活化, 活化的 NF- κ B 于是发生核易位, 同靶基因启动子或增强子上的 κ B 结合位点, 从而启动或增强这些基因的转录^[10–13]. 研究表明, NF- κ B 可以促进与炎症有关的多种基因的转录^[14–19], 从而参与多种原因引起的组织损伤过程^[20–25]. 在急性胰腺炎发生过程中, 肝组织中 NF- κ B 发生了显著活化, 活化的 NF- κ B 参与了肝损伤的发生^[6].

乌斯他丁是一种从人的尿液中提取出来的蛋白多肽, 它具有抑制多种酶活性、清除氧自由基、抑制炎症递质释放的作用. Itabashi *et al*^[26]发现, 乌斯他丁能够抑制肝脏 ICAM-1 以及 CNCI 表达, 降低血浆 TNF- α 浓度. Aosasa *et al*^[27]则证明乌斯他丁可以抑制 LPS 刺激下的单核细胞 NF- κ B 的激活, 降低 TNF- α 表达. 本实验结果显示, APU 组在术后 3–6 h NF- κ B 活化程度显著低于 AP 组, 与此同时, 血浆 ALT 在术后 6–24 h 也显著低于 AP 组. 这就说明 UTI 对急性胰腺炎肝损伤具有保护作用, 其产生作用的机制可能与抑制 NF- κ B 活化有关.

4 参考文献

- Jaffray C, Yang J, Norman J. Elastase mimics pancreatitis-induced hepatic injury via onflammatory mediators. *J Surg Res* 2000;90:95-101
- Hori Y, Takeyama Y, Ueda T, Shinkai M, Takase K, Kuroda Y. Macrophage-derived transforming growth factor- β 1 induces hepatocellular injury via apoptosis in rats severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000;127:641-469
- Li YY, Gao ZF. Acute pancreatitis and NF- κ B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:420-421
- Suk K, Yeou Kim S, Kim H. Regulation of IL-18 production by

- IFN gamma and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF- κ B pathway in the regulatory processes. *Immunol Lett* 2001;77:79-85
- Izumi T, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Li Y, Takemura G, Fujiwara H, Garbers DL, Mochizuki S, Nakao K. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF- κ B activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2001;108:203-213
- Shi L, Huang DR, Tian FZ, Wang Y, Ma JX, Li XJ, Yin ZL. The relationship between hepatic NF- κ B activation and liver injury in rats with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:554-557
- Antonelli A, Bianchi M, Crinelli R, Gentilini L, Magnani M. Modulation of ICAM-1 expression in ECV304 cells by macrophage-released cytokines. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:978-991
- Ginis I, Jaiswal R, Klimanis D, Liu J, Greenspon J, Hallenbeck JM. TNF-alpha-induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF- κ B transactivation: the role of NF- κ B association with p300 adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:142-152
- Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance IK, Hall G, Cross AS, Rogers TB. Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF- κ B activation and tumor necrosis factor-alpha expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H872-879
- Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, Evans AJ, Wedin KE, Michael LH, Entman ML. Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia. *Am J Pathol* 2001;159:1301-1311
- Moine P, McIntyre R, Schwartz MD, Kaneko D, Shenkar R, Le Tulzo Y, Moore EE, Abraham E. NF- κ B regulatory mechanisms in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Shock* 2000;13:85-91
- Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:307-314
- Omoya T, Shimizu I, Zhou Y, Okamura Y, Inoue H, Lu G, Itonaga M, Honda H, Nomura M, Ito S. Effects of idoxifene and estradiol on NF- κ B activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver* 2001;21:183-191
- Altavilla D, Saitta A, Guarini S, Galeano M, Squadrito G, Cucinotta D, Santamaria LB, Mazzeo AT, Campo GM, Ferlito M, Minutoli L, Bazzani C, Bertolini A, Caputi AP, Squadrito F. Oxidative stress causes nuclear factor-kappaB activation in acute hypovolemic hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1055-1066
- Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock* 2002;17:114-119
- Wang Z, Castresana MR, Detmer K, Newman WH. An IkappaB-alpha mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Surg Res* 2002;102:198-206
- Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, Luft FC. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2002;2:3
- Helin E, Vainionpaa R, Hyypia T, Julkunen I, Matikainen S. Measles virus activates NF- κ B and STAT transcription factors and production of IFN-alpha/beta and IL-6 in the human lung epithelial cell line A549. *Virology* 2001;290:1-10
- Zhang XY, Shimura S, Masuda T, Saitoh H, Shirato K. Antisense oligonucleotides to NF- κ B improve survival in bleomycin-induced pneumopathy of the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(4 Pt 1):1561-1568
- Ross SD, Kron IL, Gangemi JJ, Shockey KS, Stoler M, Kern JA, Tribble CG, Laubach VE. Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L528-536

- 21 Jaffray C, Yang J, Carter G, Mendez C, Norman J. Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery* 2000;128:225-231
- 22 Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000;106:867-872
- 23 Kono H, Wheeler MD, Rusyn I, Lin M, Seabra V, Rivera CA, Bradford BU, Forman DT, Thurman RG. Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF-kappaB, and TNF-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278:G652-661
- 24 Kono H, Rusyn I, Bradford BU, Connor HD, Mason RP, Thurman RG. Allopurinol prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:296-303
- 25 Okada K, Marubayashi S, Fukuma K, Yamada K, Dohi K. Effect of the 21-aminosteroid on nuclear factor-kappa B activation of Kupffer cells in endotoxin shock. *Surgery* 2000;127:79-86
- 26 Itabashi K, Ito Y, Takahashi T, Ishii K, Sato K, Kakita A. Protective effects of urinary trypsin inhibitor (UTI) on hepatic microvasculature in hypotensive brain-dead rats. *Eur Surg Res* 2002;34:330-338
- 27 Aosasa S, Ono S, Mochizuki H, Tsujimoto H, Ueno C, Matsumoto A. Mechanism of the inhibitory effect of protease inhibitor on tumor necrosis factor alpha production of monocytes. *Shock* 2001;15:101-105

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

基因表达谱芯片技术筛选 NS5ATP11 反式调节基因

王琳, 成军

王琳, 成军, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技公关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 北京市中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

王琳, 成军. 基因表达谱芯片技术筛选 NS5ATP11 反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2749-2752
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2749.asp>

摘要

目的: 应用基因芯片技术研究未知功能基因 NS5ATP11 的表达对于肝细胞基因表达谱的影响。

方法: 从 HepG2 细胞 RNA 中用反转录聚合酶链反应法(RT-PCR)扩增出 NS5ATP11 编码区 DNA, 常规分子生物学技术构建 NS5ATP11 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP11, 利用脂质体转染技术转染 HepG2 细胞, NS5ATP11 的表达以 Western blot 杂交技术证实. 从转染和非转染细胞 HepG2 中提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 并进行基因芯片技术分析。

结果: 证实构建 pcDNA3.1(-)-NS5ATP11 在 HepG2 细胞中表达正确. NS5ATP11 重组表达载体和空白载体转染的 HepG2 细胞的基因表达改变进行分析. 结果表明, 8 种基因的表达水平上调, 10 种基因的表达水平下调。

结论: NS5ATP11 对于肝细胞基因表达谱存在一定影响; 基因芯片技术是分析蛋白反式调节基因表达谱的重要技术途径, 有助于了解 NS5ATP11 对肝细胞和其他生物学功能的调节作用。

0 引言

在嗜肝病毒中丙型肝炎病毒(HCV)被认为是有引起人类肝脏疾病的主要因素, 感染全世界约 2% 的人口^[1-2]. HCV 编码的非结构蛋白 5A 是一种具有隐性反式激活作用的磷蛋白, 参与调节细胞周期、干扰素耐受、脂质和糖类的代谢以及其他细胞内信号转导, 但其对细胞进程影响的生物学机制所知很少^[3-7]. 我们分别应用酵母双杂交^[8]、抑制性消减杂交^[9]、基因芯片^[3]和 SV40 早期启动子/增强子功能分析^[10]等技术从不同角度对 NS5A 的功能进行研究得到的结果说明, NS5A 功能复杂多样. 应用基因芯片技术对 NS5A 转染的肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的基因表达谱变化进行比较研究, 我们发现了 NS5A 上调表达的未知功能基因, 命名为 NS5ATP11, 并对之进行了克隆^[11]. 我们对 NS5ATP11 转染肝癌细胞系的基因表达谱进行分析, 获得了部分上调或下调表达及未知功能基因。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态 *E.coli* JM109 (本室保存), pcDNA3.1(-) 真核表达载体 (Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂 (Gibco), mRNA Purification 试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR

肝细胞、胰岛细胞与储脂细胞共培养对肝细胞功能的影响

于聪慧, 林梅, 梅建民, 余昌中, 杨荣华, 姚军波

于聪慧, 林梅, 梅建民, 余昌中, 杨荣华, 姚军波, 北京军区总医院肝胆外科 北京市 100700

国家自然科学基金资助项目, No. 30170421

项目负责人: 于聪慧, 100700, 北京市东城区朝内北小街2号, 北京军区总医院肝胆外科, ychst@public.fhnet.cn.net

电话: 010-66721896

收稿日期: 2004-08-25 接受日期: 2004-09-09

摘要

目的: 探讨肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞共培养对肝细胞功能的影响。

方法: 采用改良胶原酶消化法分离获得大鼠肝细胞和储脂细胞, 同时利用梯度离心分离胰岛细胞。分两组实验, 肝细胞培养组(对照组), 肝细胞用 RPMI1640、胰岛素 10^{-7} mol/L、100 mL/L FBS 及地塞米松 10^{-8} mol/L 配成细胞悬液, 2 mL 放入 9 cm^2 培养瓶中连续培养 15 d (37°C 50 mL/L CO_2)。肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞共培养组(实验组): 将 1×10^7 L 的储脂细胞 2 mL 先加入培养瓶中, 培养条件及培养液同肝细胞培养组, 培养 48 h 后弃上清后将肝细胞 2×10^6 L 2 mL 和胰岛细胞(100个)分别加入并观察肝细胞存活情况; 全自动生化分析仪测定培养上清液中总蛋白及尿素氮的含量; 两组细胞均在培养 10 d 行细胞组织学及组织化学检测, 包括肝细胞 HE 染色、肝细胞内糖原 PAS 染色及葡萄糖-6-磷酸酶染色检测。

结果: 培养第 7 d 对照组部分肝细胞脱落, 核固缩, 胞质破碎分解。而实验组肝细胞粘壁生长好, 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞相间形成团状和索形。培养 10 d 对照组肝细胞核完全固缩, 胞质破碎分解, 糖原、葡萄糖-6-磷酸酶的表达消失; 实验组肝细胞呈片状, 胞质饱满, 糖原、葡萄糖-6-磷酸酶的表达良好。培养 5 d 后实验组白蛋白及尿素氮的合成明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

结论: 肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞共培养明显延长肝细胞存活期。

于聪慧, 林梅, 梅建民, 余昌中, 杨荣华, 姚军波. 肝细胞、胰岛细胞与储脂细胞共培养对肝细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2731-2733
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2731.asp>

0 引言

肝细胞和胰岛细胞混合培养能促进肝细胞功能已有许多报道^[1-2], 但肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞三种细胞混合培养是否能增强肝细胞存活时间研究较少。我们将肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞三种细胞共培养, 观察肝细胞的生长和功能表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 大鼠, δ , 质量 250-300 g, 北京大学医学部医用动物中心提供, 普通饲料喂养, 随意饮水, 室温 $22-28^\circ\text{C}$ 。胶原酶 IV 型, DNA 酶 I 型, Nycodenz 和 Ficoll-400 均购自 Sigma 公司, RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (56°C , 30 min 灭活) 购自华美化学试剂公司, 全自动生化分析仪 (TOSHIBA-7170, 日本), 二氧化碳孵育箱 CI-46 (BAXTER 公司, 美国), 兰格恒流泵 - YZ1515 (保定兰格恒流泵有限公司)。

1.2 方法 采用胶原酶消化法分离大鼠肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞。主要步骤: 首先分离出胆总管和十二指肠, 在胆管开口的上下端结扎十二指肠, 16 G 穿刺针行胆总管穿刺将 0.5 g/L 的胶原酶溶液约 5 mL 缓慢注入, 使胰腺充分膨胀后将穿刺远端的胆总管结扎; 然后将 18 G 的穿刺导针置入门静脉并固定, 同时将肾静脉远端的下腔静脉剪开并剪开膈肌夹闭肝上下腔静脉, 启动循环灌流装置。先灌流 0.2 g/L 的 EDTA (乙二胺四乙酸 Ethylenediamine tetraacetic acid) 溶液, 以 15 mL/min 的灌流速度灌注肝脏, 灌流温度 37°C , 不时地轻揉肝表面, 10 min 左右将灌流液变换为 0.5 g/L 的胶原酶溶液, 与此同时将胰腺解剖剪下放入一含 0.5 g/L 胶原酶溶液的无菌盘内由另一组人员进一步消化分离 (方法见下)。肉眼观察肝脏出现小的裂纹后停止灌流, 将肝脏剪下, 移入装有 HANK'S 液无菌平皿中。

1.2.1 分离肝细胞和储脂细胞组 将平皿放入超净台, 用无菌镊剥去肝表面的包膜, 用肝梳轻轻刮肝表面, 将肝脏的管道系统及纤维弃去, 细胞悬液经 80 目网过滤, 将细胞悬液等份置入两个 50 mL 离心管中并用 RPMI1640+100 mL/L FBS 培养液充分稀释至 50 mL 吹打均匀放低速离心机离心 5 min, 离心速度 300 r/min (20°C), 将上清液移入另外一个 50 mL 的离心管 (以下称 B 管) 中, 此上清液中富含储脂细胞; 有沉淀的管 (以下称 A 管) 富含肝细胞。A 管细胞悬液经 0.2 g/L 胶原酶孵育液 (含 DNA I 酶) 孵育 10 min (37°C 50 mL/L CO_2), 100 目网过滤, 将细胞悬液用 RPMI1640+100 mL/L FBS 培养液离心清洗 3 次, 三次的时间分别是 2, 1.5 和 1 min, 离心速度为 500 r/min (20°C) 即获得肝细胞。B 管细胞悬液经 2000 r/min 5 min, 弃上清, 加入 0.5 g/L 的胶原酶溶液放入恒温震荡器中消化 30 min (200 r/min, 37°C), 所得细胞悬液经 200 目筛网过滤, 用 RPMI1640+100 mL/L FBS 培养液离心清洗, 反复 3 次。三次的时间分别是 5, 3 min 和 2 min, 离心速度为 2000 r/min。在所得的沉淀中加入 RPMI1640 液至 12 mL, 再加入 Nycodenz 液 6 mL,

充分吹打混匀.将细胞悬液分别装入两个10 mL的锥型离心管中,在细胞悬液上小心地滴加一层 RPMI1640 液.3 000 r/min 离心 15 min(20 °C),将 RPMI1640 液与细胞悬液交界面间的细胞吸出,用 RPMI1640 液 2 000 r/min 离心冲洗 2 次,每次 7 min (20 °C)即得储脂细胞.

1.2.2 分离胰岛细胞组 将无菌盘放在冰浴上,用小镊子撕去胰腺被膜同时用小剪刀剪碎胰腺组织,将悬液倒入锥形瓶置恒温振荡器中消化 12–16 min (200 r/min, 38 °C),每 5 min 取样 30 μ L 用双硫脲染色观察发现胰岛消化良好时立即用含有 200 mL/L FBS 的培养液离心清洗 2 次.用 200 目网过滤后将沉淀和 250 mL/L Ficoll 4 mL 均匀混合,在其上小心加入 230 mL/L、200 mL/L、110 mL/L 和 RPMI1640 液各 2 mL,高速离心 20 min (3 000 r/min, 20 °C),吸出上两层界面的细胞,用 RPMI1640 液洗涤 2 次即得胰岛细胞.

1.2.3 细胞计数及存活率的判定 采用 4 g/L 台盼蓝溶液鉴定细胞存活率,并将染有台盼蓝的细胞单独计数.按公式计算细胞总数和细胞存活率.

1.2.4 三种细胞混合培养方法 肝细胞培养组(对照组):肝细胞用 RPMI 1640 + 胰岛素 10^{-7} mol/L + 100 mL/L FBS + 地塞米松 10^{-8} mol/L 配成 2×10^8 /L 的肝细胞悬液,将 2 mL 细胞悬液放入 9 cm² 的培养皿中,二氧化碳孵箱连续培养(37 °C 50 mL/L CO₂). 三种细胞共培养组(下称实验组),先将 1×10^7 /L 的储脂细胞 2 mL 加入培养瓶中,培养条件及培养液同肝细胞培养组,培养 48 h 后将培养液弃去,再加入肝细胞 2 mL(2×10^8 /L)和胰岛细胞 100 个/瓶,实验组三种细胞的培养比例为 4 000 : 200 : 1,对照组和实验组分别培养 10 瓶,培养 15 d.培养期间倒置显微镜观察细胞生长情况,隔日收集培养上清液 1 mL 放入试管封存, -20 °C 冰箱冻存待测,全自动生化检测仪检测培养液中总蛋白、尿素氮含量.两组在培养第 10 d 时分别做爬片组织学及组织化学检测,包括肝细胞 HE 染色、肝细胞内糖原 PAS 染色及葡萄糖-6-磷酸酶染色检测.

统计学处理 实验数据采用 mean \pm SD, 结果进行 *t* 检验.

2 结果

2.1 三种细胞的存活率和细胞计数 肝细胞分别为(93.5 \pm 3.5%)和(2.5 \pm 0.2) $\times 10^{11}$ /L, 储脂细胞分别为(90.5 \pm 3.5%)和(1.0 \pm 0.2) $\times 10^7$ /鼠, 胰岛细胞分别为(89.3 \pm 25%)和 462 \pm 125 个/鼠(纯化后).

2.2 两组细胞培养观察结果 在两组细胞培养的过程中通过倒置显微镜观察,实验组在培养 3 d 后肝细胞生长活跃,细胞逐渐形成呈团状和索条状,同时储脂细胞有明显的网状伪足长出,和肝细胞胰岛细胞共同生长,到培养第 10 d 时细胞长成大片状,肝细胞胞质丰满,胞核完整.而对照组肝细胞在培养第 7 d,部分细胞有脱

落,肝细胞质变稀疏,细胞核固缩,第 10 d 大部分细胞脱落.培养第 10 d 肝细胞经 HE 染色,对照组肝细胞胞质分解,细胞核固缩.实验组中 90% 的肝细胞圆形,胞质丰满,胞膜完整,细胞内糖原、葡萄糖-6-磷酸酶的表达正常.

2.3 两组细胞培养液检测结果 (图 1–2) 连续日检测肝细胞功能,结果显示,实验组培养上清液中的总蛋白和尿素氮含量较对照组明显增高, $P < 0.05$.

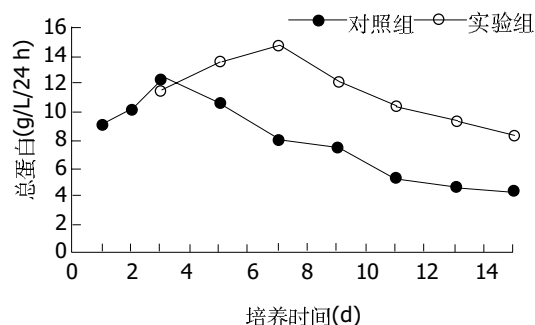


图1 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞混合培养液中白蛋白含量: 培养液总蛋白含量为 4.45 g/L.

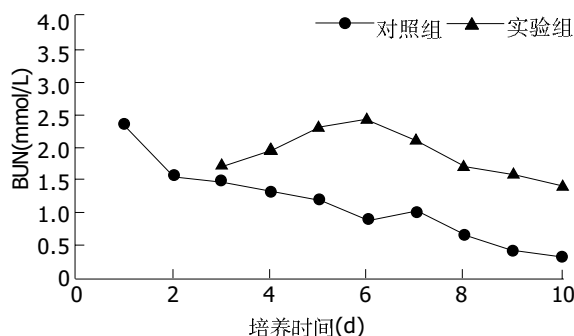


图2 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞混合培养液中尿素氮含量: 总尿素氮为 0.43 mmol/L.

3 讨论

肝细胞生长需要良好的内环境,胰岛素是肝细胞生长过程中的重要因素之一,能促进肝细胞糖原和蛋白质的合成,同时肝细胞和其共生细胞之间的连接也是肝细胞生长、分裂、细胞间信号传导的重要条件^[3–8],大量的研究表明,肝细胞在生长过程中需要良好的立体结构才能使细胞的功能良好的发挥^[9–12].储脂细胞呈伪足样生长,良好的纤维臂呈网络样,是肝细胞生存的良好框架^[13–15].我们的结果表明,三种细胞培养能够提高肝细胞存活时间和功能表达,但影响因素有多种,其中培养顺序和三种细胞的培养比例是影响细胞生长的重要因素,三种细胞中储脂细胞贴壁时间最长大约 48 h,肝细胞和胰岛细胞贴壁时间相近.我们采取先培养储脂细胞 48 h 后,待观察到储脂细胞已有部分纤维丝伸展出来后再将肝细胞和胰岛细胞接种于上,结果较满意,肝细胞有良好的功能表达,细胞贴壁好,生存

时间明显延长. 另外, 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞的培养比例仍需要进一步摸索. 在实验中, 我们对三种细胞培养比例进行了大量摸索实验(实验结果待发表), 结果发现肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞以 4 000 : 200 : 1 配比培养较为合适. 我们认为肝细胞生长虽然需要良好的框架, 但是在整体的培养体系中, 储脂细胞需要适当的数量才有利于肝细胞的生长, 过多的储脂细胞将会限制肝细胞的生长.

4 参考文献

- 1 Kaufmann PM, Fiegel HC, Kneser U, Pollok JM, Kluth D, Rogiers X. Influence of pancreatic islets on growth and differentiation of hepatocytes in co-culture. *Tissue Eng* 1999;5: 583-596
- 2 Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Herbst H, Rogiers X. Heterotopic hepatocyte transplantation utilizing pancreatic islet cotransplantation for hepatotrophic stimulation: morphologic and morphometric evaluation. *Pediatr Surg Int* 1999;15:168-174
- 3 Murakami S, Ijima H, Ono T, Kawakami K. Development of co-culture system of hepatocytes with bone marrow cells for expression and maintenance of hepatic functions. *Int J Artif Organs* 2004;27:118-126
- 4 Agius L. Metabolic interactions of parenchymal hepatocytes and dividing epithelial cells in co-culture. *Biochem J* 1998; 252:23-28
- 5 Miura K, Nagai H, Ueno Y, Goto T, Mikami K, Nakane K, Yoneyama K, Watanabe D, Terada K, Sugiyama T, Imai K, Senoo H, Watanabe S. Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:415-423
- 6 Arnaud A, Fontana L, Saez-Lara MJ, Gil A, Lopez-Pedrosa JM. Exogenous nucleosides modulate the expression of rat liver extracellular matrix genes in single cultures of primary hepatocytes and a liver stellate cell line and in their co-culture. *Clin Nutr* 2004;23:43-51
- 7 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999;13:1883-1900
- 8 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated co-cultures. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:1137-1160
- 9 Griffith LG, Wu B, Cima MJ, Powers MJ, Chaognaud B, Vacanti JP. *In vitro* organogenesis of liver tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1997;831:382-397
- 10 Kudryavtseva EI, Engelhardt NV. Requirement of 3D extracellular network for maintenance of mature hepatocyte morphology and suppression of alpha-fetoprotein synthesis in vitro. *Immunol Lett* 2003;90:25-31
- 11 De Bartolo L, Bader A. Review of a flat membrane bioreactor as a bioartificial liver. *Ann Transplant* 2001;6:40-46
- 12 Bhandari RN, Riccalton LA, Lewis AL, Fry JR, Hammond AH, Tendler SJ, Shakesheff KM. Liver tissue engineering: a role for co-culture systems in modifying hepatocyte function and viability. *Tissue Eng* 2001;7:345-357
- 13 Rojkind M, Novikoff PM, Greenwel P, Rubin J, Rojas-Valencia L, de Carvalho AC, Stockert R, Spray D, Hertzberg EL, Wolkoff AW. Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *Am J Pathol* 1995;146:1508-520
- 14 Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 1992;15:5-11
- 15 Uyama N, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Okuyama H, Imuro Y, Yamaoka Y. Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells. *J Hepatol* 2002;36:590-599

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

乙型肝炎病毒前-S 蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化

蔺淑梅, 成军, 张树林, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨媛, 白桂琴

蔺淑梅, 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
成军, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨媛, 白桂琴, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒前-S 蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化.

方法: 构建前-S 的酵母细胞表达载体, 采用酵母双杂

交系统筛选人肝细胞cDNA文库, 利用核苷酸数据库及生物信息学技术, 对于筛选结果进行分析. 发现其中有1个未知功能的新基因. 根据GenBank中的序列信息设计引物, 以HepG2细胞系cDNA文库为模板, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长编码序列, 并经测序证实, 命名该新基因为PPSBP9并在GenBank中注册, 注册号为AY553877.

结果: PPSBP9基因的编码序列全长为840个核苷酸(nt), 编码产物由279个氨基酸残基(aa)组成. 经核苷酸序列数据库(GenBank)和蛋白质一级结构序列数据库(SwissProt)同源序列的搜寻, 与已知基因序列和蛋白序列之间没有显著同源性.

结论: 筛选并成功的克隆了乙型肝炎病毒前-S蛋白与肝细胞cDNA文库中结合蛋白新基因PPSBP9, 为进一步

研究HBV前-前-S及其肝细胞结合蛋白新基因在HBV致病中的作用奠定了基础。

蔺淑梅, 成军, 张树林, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨媛, 白桂琴. 乙型肝炎病毒前-前-S蛋白结合蛋白新基因PPSBP9的克隆化. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2733-2736

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2733.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染常见, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关^[1-6]. HBV是很小的包膜病毒, HBV基因组全长在3200个核苷酸(nt)左右, 为部分双链DNA病毒. HBV至少含有4个开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区, 4个ORF中表达的氨基酸长度不同, 其生物学功能也不相同, 其中全S区又因不同的起始密码子(ATG)而又人为的分为前-S1、前-S2和S三个区, 前-S1、前-S2和表面抗原主蛋白是按照同一开放读码顺序(in frame)进行翻译的. 最近董菁 *et al* 对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现在前-S1区之前还存在一个ORF, 长度135 bp, 编码45 aa, 将其命名为前-前-S区. 并在既往已克隆的HBV基因组中得到了证实^[7]. 杨倩 *et al* 对前-前-S基因启动子序列的鉴定和转录活性的研究证实, 前-前-S-基因ORF上游的序列具有启动子活性, 进一步证实了董菁 *et al* 发现的前-前-S编码基因存在^[8]. 基因是通过蛋白质之间的相互作用而实现其功能的, 病毒蛋白和肝细胞蛋白之间的作用是病毒致病的关键. 为进一步研究前-前-S-基因在HBV致病中的作用, 我们利用酵母双杂交技术对肝细胞cDNA文库中与乙型肝炎病毒前-前-S相互作用的蛋白进行研究, 获得了一种能与HBV前-前-S蛋白结合的未知功能蛋白, 将编码该蛋白的基因命名为PPSBP9, 对其进行克隆化研究, 为今后进一步深入地研究新基因的生物学功能鉴定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 pGBKT7-BD克隆载体, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、人cDNA肝细胞文库等均购自Clontech公司. 酵母YPDA培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基, X- α -半乳糖苷酶(Gal)等购自Clontech公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司. 复杂高效感受态(FSB), 本室自制. 大肠杆菌(DH5 α), 本室保存. Taq酶、T4 DNA连接酶、*EcoRI*、*BamHI*等限制性内切酶、pGEM-T载体及RT-PCR试剂盒购自Promega公司. 玻璃奶回收试剂盒购自博大公司. 新基因PPSBP9的扩增引物合成及DNA序列测定由上海生工生物工程技术有限公司承担.

1.2 诱饵质粒载体的构建及酵母配合实验 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBV前-前-S蛋7中构建诱饵质粒, 酶切鉴定后, 用醋酸锂法转入酵母细胞AH109, 并在四缺培养基上培白编码基因, 连接入酵母表达载体pGBKT-养以排除其自身激活作用^[9]. 挑取3 mm大小在SD/-Trp培养基上生长的转化了pGBKT7-前-前-S质粒的酵母AH109单菌落接种于SD/-Trp培养基中, 30℃ 250 r/min 振荡过夜, 次日离心后用2 × YPDA 培养液5 mL 重悬细胞, 计数浓度大于1 × 10⁹ 细胞/mL, 与肝细胞文库酵母细胞在50 mL 2 × YPDA中30℃轻摇配合约22 h, 离心后用0.25 × YPDA 8 mL 重悬细胞, 分别铺板于150 mm的SD/-Trp/-Leu/-His(3缺), SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade(4缺)培养基板各25块上, 同时将配合产物按1:100、1:1 000、1:10 000铺于SD/-Trp、SD/-Leu及SD/-Trp/-Leu培养基上检验配合效率. 生长10-14 d后挑取直径大于3 mm的菌落再次画线于铺有X- α -gal的4缺培养基上检查 α -半乳糖苷酶活性, 认为在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落.

1.3 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南Lyticase法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的SOB平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆DNA测序后, 提交GenBank比对, 进行生物信息学分析.

1.4 多聚酶链反应(PCR)扩增PPSBP9新基因 根据GenBank的序列信息设计上下游引物. 上游引物: 5' -GAA TTC ATG CCA TAT ATT CCT CTC A-3', 下游引物: 5' -GGA TCC CTA ATA CAA ATG TAT GTG G-3'. 提取HepG2细胞的总RNA, 进行反转录, 以反转录产物为模板进行PCR, PCR参数如下: 94℃ 5 min 预变性, 94℃ 1 min 变性, 58℃ 1 min 退火, 72℃ 1 min 延伸, 共35个循环, 72℃再延伸10 min.

1.5 克隆目的片段 将PCR产物在12 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 切取目的片段, 玻璃奶法回收PCR产物, 与pGEM-T载体连接, 转化DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上, 37℃培养15 h. 挑取阳性菌落, 增菌. 提取质粒进行限制性酶切分析鉴定, 选择经鉴定的菌落送测序.

2 结果

2.1 pGBKT7-p-p-S诱饵与肝细胞文库酵母菌株配合结果 我们共挑选54个阳性克隆测序, 测序结果与GenBank数据库进行初步比较, 其中8个克隆为未知功能蛋白基因. 其余46个均与已知基因序列高度同源.

2.2 新基因的序列分析及全长基因的获得 对所筛选到的未知功能蛋白基因其中之一利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN), 发现该克隆序列与GenBank中注册的

已知功能基因序列没有同源. 电子拼接推定该基因的开放读码框架, 设计引物, 从HepG2细胞提取总RNA后, 进行RT-PCR, PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见1条清晰、单一、大小约840 bp的特异性扩增条带(图1), 其大小与预计的相吻合. PCR产物与T-载体连接, 转化大肠杆菌, 提取质粒进行酶切鉴定后送测序. 测序结果完全符合拼接序列, 表明我们已成功克隆出新基因的完整序列, 命名为PPSBP9, 其编码序列全长为840个核苷酸, 编码产物由279个氨基酸残基组成(图2). GenBank注册号为AY553877.

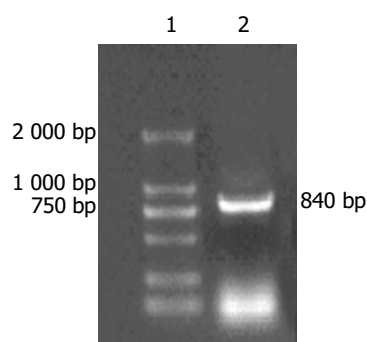


图1 PPSBP9基因的RT-PCR产物凝胶电泳图. 1: DNA marker; 2: PCR product.

ATG CCA TAT ATT CCT CTC ATG GAG TTC AGT
M P Y I P L M E F S
TGT TCA CAT TCT CAC TTA GTA TGC TTA CCC
C S H S H L V C L P
GCA GAG TGG AGG ACT AGC TGT ATG CCC AGT
A E W R T S C M P S
TCC AAA ATG AAG GAG ATG AGC TCG TTA TTT
S K M K E M S S L F
CCA GAA GAC TGG TAC CAA TTT GTT CTA AGG
P E D W Y Q F V L R
CAG TTG GAA TGT TAT CAT TCA GAA GAG AAG
Q L E C Y H S E E K
GCC TCA AAT GTA CTG GAA GAA ATT GCC AAG
A S N V L E E I A K
GAC AAA GTT TTA AAA GAC TTT TAT GTT CAT
D K V L K D F Y V H
ACA GTA ATG ACT TGT TAT TTT AGT TTA TTT
T V M T C Y F S L F
GGA ATA GAC AAT ATG GCT CCT AGT CCT GGT
G I D N M A P S P G
CAT ATA TTG AGA GTT TAC GGT GGT GTT TTG
H I L R V Y G G V L
CCT TGG TCT GTT GCT TTG GAC TGG CTC ACA
P W S V A L D W L T
GAA AAG CCA GAA CTG TTT CAA CTA GCA CTG
E K P E L F Q L A L
AAA GCA TTC AGG TAT ACT CTG AAA CTA ATG
K A F R Y T L K L M

ATT GAT AAA GCA AGT TTA GGT CCA ATA GAA
I D K A S L G P I E
GAC TTT AGA GAA CTG ATT AAG TAC CTT GAA
D F R E L I K Y L E
GAA TAT GAA CGT GAC TGG TAC ATT GGT TTG
E Y E R D W Y I G L
GTA TCT GAT GAA AAG TGG AAG GAA GCA ATT
V S D E K W K E A I
TTA CAA GAA AAG CCA TAC TTG TTT TCT CTG
L Q E K P Y L F S L
GGG TAT GAT TCT AAT ATG GGA ATT TAC ACT
G Y D S N M G I Y T
GGG AGA GTG CTT AGC CTT CAA GAA TTA TTG
G R V L S L Q E L L
ATC CAA GTG GGA AAG TTA AAT CCT GAA GCT
I Q V G K L N P E A
GTT AGA GGT CAG TGG GCC AAT CTT TCA TGG
V R G Q W A N L S W
GAA TTA CTT TAT GCC ACA AAC GAT GAT GAA
E L L Y A T N D D E
GAA CGT TAT AGT ATA CAA GCT CAT CCA CTA
E R Y S I Q A H P L
CTT TTA AGA AAT CTT ACG GTA CAA GCA GCA
L L R N L T V Q A A
GAA CCT CCC CTG GGA TAT CCG ATT TAT TCT
E P P L G Y P I Y S
TCA AAA CCT CTC CAC ATA CAT TTG TAT TAG
S K P L H I H L Y *

图2 PPSBP9基因的核苷酸序列及编码产物一级结构序列.

3 讨论

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白-蛋白相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下相互作用提供了一种新的遗传学方法. 我们利用此技术, 已成功筛选到一系列与乙肝病毒蛋白及丙肝病毒蛋白相结合的蛋白基因, 其中, 也包括了一些未知功能蛋白的基因^[9-11].

1979年Galibert *et al*^[12-13]首次报告了HBV基因组的全序列, 并确定4个主要的开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区, 一直沿用至今. HBV基因组只有3.2 kb, 其结构特点是结构基因与功能基因序列之间重叠, 甚至结构基因序列之间重叠^[14]. 关于这一紧密DNA结构中是否存在新的编码序列, 一直没有进行系统的研究. 最近董菁 *et al*^[7-8, 15-19]对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现了前-S和前-X基因序列, 改写了HBV DNA编码基因序列研究的历史.

HBV表面抗原即外膜蛋白不仅是病毒遗传结构的包装蛋白, 病毒感染所必需, 也是引起宿主保护性应

答的免疫原表位,而且截短型表面抗原中蛋白和大蛋白具有反式激活作用^[7],这种功能是与表面抗原的多种形式激活癌基因有关^[20]。董菁*et al*进一步应用DNA SIS软件的蛋白质分析功能分析了前-前-S、前-S1、前-S2和S基因的完全表达产物,前-前-S区较以往认为的大蛋白多出一个小的疏水区,那么全S蛋白(含前-前-S区)与大蛋白有不小的差异。其中的19(21)个疏水氨基酸在前-前-S区形成了一个小的疏水功能域,可能与蛋白的空间折叠或表面蛋白合成后分泌有关。进一步研究前-前-S所编码蛋白的功能及与之相互作用的蛋白具有重要意义。

我们应用酵母双杂交技术成功的筛选出肝细胞文库中与前-前-S蛋白相互作用的蛋白基因54种,其中包括HBV前-前-S蛋白结合蛋白9这一未知功能的新基因。根据GenBank的信息,电子拼接推定该基因的开放读码框架获得相应的全长编码基因,我们设计了新基因的上下游引物,并成功地从HepG2细胞的mRNA中逆转录出该基因的完整序列。PCR反应产物经T-A克隆测序完全符合计算机分析结果,表明我们已顺利得到了该新基因的编码序列,其编码序列全长为840个核苷酸,编码279个氨基酸残基。值得我们关注的是,在对这一未知功能新基因进行进一步生物信息学分析时发现,我们这一研究小组在用酵母双杂交技术筛选HCV F蛋白与肝细胞文库相互作用的蛋白时也筛选到这一相同的未知功能的新基因,故我们将其命名为PPSBP9/HCVFbp2。表明这一未知功能基因能与多种病毒蛋白结合,提示这一未知功能基因可能在HBV, HCV感染的致病过程中发挥重要作用。新基因的发现及克隆化成功为今后进一步深入地研究新基因的生物学功能奠定了基础。

4 参考文献

- 1 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000:1
- 2 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列准种个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 3 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 4 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 5 Walton CM, Wu CH, Wu GY. A ribonuclease H-oligo DNA conjugate that specifically cleaves hepatitis B viral messenger RNA. *Bioconjug Chem* 2001;12:770-775
- 6 Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002;277:24361-24367
- 7 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 8 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:761-762
- 9 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBeAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 10 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5B结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. 解放军医学杂志 2003;28:768-770
- 11 王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 梁耀东, 刘敏. 应用白细胞表达型cDNA文库的酵母双杂交技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白5A的结合蛋白. 中西医结合肝病杂志 2003;13:340-342
- 12 Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 1979;281:646-650
- 13 Charnay P, Mandart E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P, Galibert F. Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Nucleic Acids Res* 1979;7:335-346
- 14 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68
- 15 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1097-1101
- 16 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 王琳, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:765-767
- 17 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 李莉. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 18 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 19 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. HBsAg与抗-HBs同时阳性者体内S基因序列分析. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 20 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000:96-100

应用噬菌体展示技术筛选 HBsAg 启动子 I 的 DNA 结合蛋白

杨艳杰, 成军, 陈东风, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖

杨艳杰, 成军, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100038
陈东风, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科 重庆市 400038
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-06-09

摘要

目的: 通过筛选HBsAg基因启动子I(SPI, surface promoter I)结合蛋白, 为HBV复制机制的研究探索新的途径。

方法: 应用噬菌体展示技术, 以HBsAg基因启动子I的聚合酶链反应(PCR)产物DNA作为固相筛选分子, 对噬菌体人肝细胞cDNA文库进行4轮“黏附-洗脱-扩增”筛选过程, 经噬斑的PCR扩增后, 构建克隆载体, 最后对所筛选克隆进行DNA序列分析和同源性搜索。

结果: 噬菌体经富集后, 从随机筛选的14个克隆中得到8个阳性克隆, 成功构建了克隆载体。序列测定后经过同源性搜索, 确定了和HBV表面抗原基因启动子I特异结合的肝细胞蛋白, 共编码7种蛋白。其中3个克隆编码未知功能蛋白; 其余的克隆分别编码4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白、复制蛋白等蛋白。

结论: 用噬菌体人肝cDNA文库筛选得到HBsAg基因启动子I的结合蛋白, 分析了该蛋白的编码基因。

杨艳杰, 成军, 陈东风, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖. 应用噬菌体展示技术筛选HBsAg启动子I的DNA结合蛋白. 世界华人消化杂志 2004; 12(11):2737-2739
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2737.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)持续感染导致全球性健康问题。世界人口约6%是病毒携带者, 因此HBV是慢性肝病的重要病原体, 且是引发肝细胞癌(HCC)的重要因素^[1-5], 而病毒基因组编码的蛋白与宿主肝细胞之间的相互作用, 可能是病毒致肝细胞癌的重要分子机制^[6-12]。HBV基因组分为结构基因序列和调节基因序列两大部分。调节基因序列和结构基因序列相互重叠, 即使结构基因序列本身也有部分重叠, 因此, HBV具有结构紧密的特点。HBsAg基因含有两个串联的启动子SPI和SPII。其中SPI(2 219-2 780 nt)调节2.4 kb mRNA的转

录, 编码表面抗原大蛋白。在HBV复制中具有十分重要的作用。SPI含有典型TATA盒序列, 其上游50 bp处为肝细胞特异性核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)I结合位点。该结合位点是HBV转录调节的重要组成部分, 也是HBV嗜肝性的重要原因之一; 这一位点可能还有其他肝特异因子与之结合, 从而调节2.4 kb mRNA的转录^[13-14]。另外, SPI的腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)核苷酸丰富区中还有一个AFP-1(一种可与AFP基因的增强子及启动子结合的核因子)结合位点, 也可能与肝细胞特异性的转录有关。因此, 作为指导前-S基因组RNA转录的SPI启动子在HBV的生活周期中具有十分重要的作用。为了寻找与SPI结合的肝特异性转录作用因子, 进一步探讨SPI的转录调节机制, 我们应用噬菌体展示技术, 利用人肝细胞cDNA文库, 以生物素化的SPI的DNA作为固相分子进行筛选, 研究影响HBV DNA复制的肝细胞蛋白的结构和功能。

1 材料和方法

1.1 材料 T7 select 人肝细胞cDNA文库, 受体菌BLT5615 (Novagen公司), 质粒pGEM-Teasy和pcDNA3.1(-) (Promega公司), Taq酶、琼脂糖、dNTP、T4连接酶、RNA酶、玻璃奶DNA回收试剂盒(博大科技), EcoRI、BamHI、MluI、NheI (购于宝生物公司), 热循环仪、凝胶成像仪、酶联吸附读数仪、大肠杆菌DH5 α 、pCP10质粒为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 肝细胞cDNA文库的筛选 HBV SPI启动子的扩增根据HBV *ayw*的基因序列, 在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡核苷酸引物, 并用生物素标记, P1: 5' -ACG CGT GAA CAT CTA GTT AAT C-3', P2: 5' -GCT AGC GCT GTA GAT CTT GTT C-3' 在引物5'端分别引入MluI和NheI位点, 由赛百盛公司合成。在0.5 mL Ep管中依次加入17 μ L双蒸水, 2.5 μ L的10 \times 缓冲液(含20 mmol/L MgCl₂), 2 μ L 2 mmol/L dNTP, 1 μ L 12.5 μ mol/L P1和P2, 1 μ L pCP10质粒, 0.5 μ L Taq酶(5 Mu/L)。放入PE 9 600 PCR仪中扩增。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C变性60 s, 57 $^{\circ}$ C退火60 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 循环33次后, 72 $^{\circ}$ C保温10 min。10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。玻璃奶法回收DNA片段。文库扩增: 将BLT5615新鲜克隆在3 mL LB/Amp内振荡, 37 $^{\circ}$ C过夜。在3 mL LB/Amp内加入30 μ L振荡细菌, 将细菌浓度摇至A₆₀₀值0.5, 加入30 μ L IPTG, 再振荡30 min后加入噬菌体文库5 μ L。37 $^{\circ}$ C振荡1-3 h直到观察到

细菌裂解. 8 000 *g* 离心 10 min, 将上清移至另一无菌 Ep 管中, 4 °C 保存. 链亲和素 20 μ L (1 g/L) 包被微孔板, 4 °C 过夜. 1 \times TBS 洗涤, 加入 100 μ L SP I 启动子 DNA 回收片段, 4 °C 过夜. 1 \times TBST (5 g/L Tween-20) 洗涤 5 遍, 加入文库扩增裂解液 100 μ L, 4 °C 过夜. 1 \times TBST 洗板 5 次, 加入 100 μ L T7 洗脱缓冲液, 室温孵育 20 min, 将洗脱液移至另一无菌 Ep 管中. 将 15 μ L 洗脱噬菌体加入 3 mL 中对数生长期的细菌培养液, 37 °C 振荡培养, 直到看到细菌裂解. 8 000 *g* 离心 10 min, 将上清移到一新 Ep 管, 4 °C 保存备下一轮筛选用. 每轮筛选后, 均做噬斑分析. 按上述步骤再筛选 5 遍.

1.2.2 噬斑的 PCR 扩增 刮取第 5 轮筛选后的阳性噬斑, 置于 100 μ L pH 8.0 的 10 mol/L EDTA 的 Ep 管中, 65 °C 加热 10 min, 14 000 *g* 离心 10 min 至澄清. 在 0.5 mL 管中依次加入 40 μ L 双蒸水, 5 μ L 的 10 \times 缓冲液 (含 20 mmol/L MgCl₂), 4 μ L 2 mmol/L dNTP, 1 μ L 12.5 μ mol/L T7 select 上游引物 P3: 5' -GGA GCT GTC GTA TTC CAG TC-3' 和下游引物 P4: 5' -AAC CCC TCA AGA CCC GTT TA-3', 1 μ L pCP10 质粒, 0.5 μ L Taq 酶 (5 Mu/L) 放入 PE 9 600 PCR 仪中扩增. 扩增条件: 94 °C 变性 60 s, 50 °C 退火 55 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 35 次后, 72 °C 保温 10 min. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果. 玻璃奶法回收 DNA 片段.

1.2.3 序列比对和同源性分析 将纯化的噬斑 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体混合, 在 16 °C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒, 进行酶切鉴定. 以酶切鉴定阳性的重组子为模板, 进行目的基因的 DNA 序列测定, 序列测定由上海博亚生物公司完成. 同源性搜索由以下网址上的 BLASTn 软件完成 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>).

2 结果

2.1 肝细胞 cDNA 文库的筛选 以固相化的 SPI 启动子 DNA 片段作为支持分子, 对肝细胞 cDNA 文库进行 4 轮 “吸附-洗脱-扩增” 的筛选. 噬菌体的富集结果见表 1. 从固相平板洗脱的噬菌体数显示了明显的增加趋势, 第 4 轮与第 1 轮相比, 富集了 356 倍 (富集倍数 = 第 4 轮产出率 / 第 1 轮产出率 产出率 = 洗脱的噬菌体数量 / 所用的噬菌体数量).

表 1 亲和筛选对噬菌体的富集

筛选次数	噬菌体数		产出率
	投入	捕获	
第 1 轮	3.5×10^8	2.5×10^{11}	7.1×10^2
第 2 轮	2.5×10^{11}	2.6×10^{15}	1.0×10^4
第 3 轮	2.6×10^{15}	1.5×10^{20}	5.8×10^4
第 4 轮	1.5×10^{20}	3.8×10^{25}	2.5×10^5

2.2 目的基因的 PCR 扩增 经过 4 轮筛选, 随机挑取 14 个噬斑为模板, 用 T7 select 引物进行 PCR 扩增, PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 结果产生片段大小不等的条带 (图 1), 用同一噬斑裂解液重复 PCR 得到相同结果.

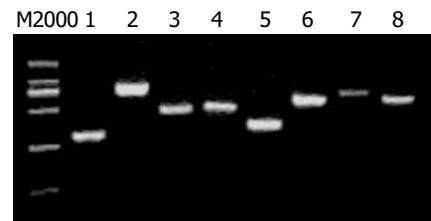


图 1 阳性噬斑裂解液 PCR 扩增.

2.3 序列比对和同源性分析 对阳性克隆基因的 DNA 序列测定, 及根据 GenBank 数据库提供的数据库进行 BLASTn 同源性搜索, 8 个阳性克隆筛选到启动子 DNA 结合蛋白, 共编码 7 种蛋白. 其中 3 个克隆编码未知功能蛋白; 其余的克隆分别编码 4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白、复制蛋白等蛋白 (表 2).

表 2 应用噬菌体展示技术筛选到的阳性克隆

编号	编码蛋白	同源性 (%)	克隆数
1	isolate 183 mitochondrion (孤立线粒体 183)	99	1
2	RF-C/activator 1 homolog (释放因子 C/激活因子 1 同源体)	100	1
3	hypothetical protein MGC9515 (人类假想蛋白 MGC9515)	99	2
4	haptoglobin (触珠蛋白)	99	1
5	4-aminobutyrate aminotransferase (4-氨基丁酸氨基转移酶)	100	1
6	chromosome 3 clone RP11-801L18 (复制蛋白 11-801L18)	100	1
7	hypothetical protein FLJ22056 (人类假想蛋白 FLJ22056)	100	1

3 讨论

作为调节元件的一段 DNA 序列, 可与某些细胞蛋白或病毒蛋白结合, 正性或负性调节转录. HBV 的 SP I 启动子是 HBV 的一个重要调节元件. 转录因子 HNF1 和 HNF3 对 SP I 的转录调节具有重要作用, 他们作用的位置在肝脏而不在其他组织. 这两种因子协同作用可能抑制 2.4 kb mRNA 的转录. 在多聚腺苷酸 (PolyA) 加尾信号、糖皮质激素应答元件 (GRE)、增强子 I (ENH I)、增强子 II (ENH II) 和 HBxAg 及其他的细胞因子作用下顺式或反式激活 SP I, 开始发挥调节功能^[15-16]. SP I 调节 2.4 kb 的 mRNA 转录, 编码大蛋白. 对 HBV 转基因鼠的研究显示, 2.4 kb mRNA 在肝组织内呈严格分布, 具有高度的嗜肝性. 由于大蛋白的增加易导致病毒包膜蛋白在细胞内蓄积, 引起细胞病变效应^[17-18]. HBV 各种包膜蛋白的这种比例不仅有利于感染性 HBV 颗粒成熟和释放, 而且有利于宿主细胞的生存, 使二者能共生共存^[19-20]. 因此, 3 种外膜蛋白的产量有正常比例, 大蛋白过量时, 将顺式干扰 SP II, 从而降低基因的转

录水平. Li *et al*^[21]从1例慢性肝炎患者血清中分离到S基因启动子缺失变异株, 转染肝癌细胞后, 大蛋白过度表达, 而中、主蛋白表达减少, 因而病毒及亚病毒颗粒的分泌都受到抑制, 肝细胞内大蛋白堆积, 认为可能是慢性肝炎肝细胞毛玻璃样变性的原因. 他们进一步研究发现, 过度表达的大蛋白在肝细胞内质网通过激活grp78和grp94启动子, 改变宿主细胞的生理功能^[22-24]. 转基因小鼠模型已经证实, 若大蛋白过度表达, 在肝细胞内堆积, 将导致肝细胞内质网肿胀, 肝细胞变性. 因此, 在感染过程中, 改变大、中、小蛋白的比例将影响疾病的进程.

我们以已知启动子DNA序列筛选出与其相结合的蛋白编码基因, 通过生物信息分析来确定该蛋白质的名称. 经过4轮“吸附-洗脱-扩增”筛选过程, 结果得到了8个阳性克隆, 共表达7种蛋白. 其中有3个为未知功能蛋白, 对已知功能蛋白, 如4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白(haptoglobin)、复制蛋白等蛋白的结合作用, 尚未见有文献报道, 需体外结合及真核细胞共转染等实验进一步证实. 总之, 本实验应用噬菌体展示技术, 试图寻找与HBV SPI启动子结合的肝特异蛋白及HBV、特别是表面抗原大蛋白严格嗜肝性的原因, 探索病毒表面抗原大蛋白转录、翻译的调控机制. 通过本实验, 我们筛选到了一些与SPI启动子序列特异结合的蛋白, 为今后更好地了解HBV的转录调控机制及其生活史打下了基础.

4 参考文献

- Dai LC, Yao X, Lu YL, Ping JL, Zhang BW, Ni CR. Expression of midkine and its relationship with HBV infection in hepatocellular carcinomas. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:1691-1693
- Huo TI, Wu JC, Lui WY, Lee PC, Huang YH, Chau GY, Tsay SH, Chang FY, Lee SD. Diabetes mellitus is a recurrence-independent risk factor in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma undergoing resection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:1203-1208
- Fujioka S, Shimomura H, Iwasaki Y, Fujio K, Nakagawa H, Onishi Y, Takagi S, Taniguchi H, Umeoka F, Nakajima H, Moriya A, Nanba K, Piao CY, Shinji T, Koide N, Shiratori Y. Hepatitis B virus gene in liver tissue promotes hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Dig Dis Sci* 2003;48:1920-1924
- Wang T, Wang Y, Wu MC, Guan XY, Yin ZF. Activating mechanism of transcription NF-kappaB regulated by hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:356-360
- Kwon JA, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral core protein (HBc) in human liver cells. *Biol Chem* 2003;384:203-212
- 柯亨宁, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹, 田秀兰. 表面抗原DNA疫苗诱导小鼠体液免疫及抑制转基因鼠表面抗原的产生. *中华内科杂志* 2000;39:319-322
- 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 董菁, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. *肝脏* 2000;5:130-132
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003;124:327-334
- Raimondo G, Costantino L, Caccamo G, Pollicino T, Squadrito G, Cacciola I, Brancatelli S. Non-sequencing molecular approaches to identify preS2-defective hepatitis B virus variants proved to be associated with severe liver diseases. *J Hepatol* 2004;40:515-519
- Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *China J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究. *中华医学杂志* 2002;82:81-85
- Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-262
- Cai YN, Zhou Q, Kong YY, Li M, Viollet B, Xie YH, Wang Y. LRH-1/hB1F and HNF1 synergistically up-regulate hepatitis B virus gene transcription and DNA replication. *Cell Res* 2003;13:451-458
- Schulte-Frohlinde E, Seidler B, Burkard I, Freilinger T, Lersch C, Erfle V, Foster GR, Classen M. Different activities of type I interferons on hepatitis B virus core promoter regulated transcription. *Cytokine* 2002;17:214-220
- Li J, Xu Z, Zheng Y, Johnson DL, Ou JH. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins. *J Virol* 2002;76:5875-5881
- Waris G, Siddiqui A. Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hepatitis B virus enhancer 1 function. *J Virol* 2002;76:2721-2729
- Tu Y, Qi Z, Yang P, Pan Y, Yu S, Du M, Li G. Transgenic mice model of human hepatitis B virus x gene. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2000;22:263-265
- Raney AK, Eggers CM, Kline EF, Guidotti LG, Pontoglio M, Yaniv M, McLachlan A. Nuclear covalently closed circular viral genomic DNA in the liver of hepatocyte nuclear factor 1 alpha-null hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2001;75:2900-2911
- Bock CT, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology* 1999;29:1236-1247
- Cha JY, Kim H, Kim KS, Hur MW, Ahn Y. Identification of transacting factors responsible for the tissue-specific expression of human glucose transporter type 2 isoform gene. Co-operative role of hepatocyte nuclear factors 1alpha and 3beta. *J Biol Chem* 2000;275:18358-18365
- Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor. *J Virol* 2001;75:8400-8406
- Reifenberg K, Wilts H, Lohler J, Nusser P, Hanano R, Guidotti LG, Chisari FV, Schlicht HJ. The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression in vivo. *J Virol* 1999;73:10399-10405
- Xu Z, Yen TS, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, Ou JH. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol* 2002;76:2579-2584
- Barnabas S, Andrisani OM. Different regions of hepatitis B virus X protein are required for enhancement of bZip-mediated transactivation versus transrepression. *J Virol* 2000;74:83-90

抗肝癌人源化 Diabody 在大肠杆菌中的可溶性表达及活性鉴定

孙志伟, 赵君, 王双, 俞炜源, 刘彦仿

孙志伟, 王双, 俞炜源, 军事医学科学院生物工程研究所 北京市 10071
赵君, 刘彦仿, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室
陕西省西安市 710032
国家自然科学基金资助, No. 30171065
项目负责人: 孙志伟, 100071, 北京市军事医学科学院生物工程研究所蛋白
质工程研究室, szwyh@263.net
电话: 010-66948819 传真: 010-63833521
收稿日期: 2004-08-30 接受日期: 2004-10-11

摘要

目的: 构建人源化抗肝癌双价抗体, 并实现其在大肠杆菌中的可溶性表达。

方法: 缩短人源化抗肝癌单链抗体 hscFv₂₅ 的连接肽为 5 肽, 构建(hscFv₂₅)₂ 基因, 克隆入原核表达载体后, 转化入大肠杆菌表达, 并纯化目的蛋白, 细胞 ELISA、免疫组织化学法检测其生物活性。

结果: 目的基因在大肠杆菌中得到了可溶性表达, 纯化蛋白的相对亲和力比亲本抗体提高了 10 倍左右, 对肝癌组织切片的免疫组织化学染色呈强阳性, 阳性率为 75%。

结论: 成功制备了人源化抗肝癌双价抗体, 该抗体具有较高的亲和力, 为进一步的临床研究奠定了基础。

孙志伟, 赵君, 王双, 俞炜源, 刘彦仿. 抗肝癌人源化 Diabody 在大肠杆菌中的可溶性表达及活性鉴定. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2740-2742
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2740.asp>

0 引言

Diabody 是单链抗体的二聚体形式, 相对分子质量大约 M_r 55 000 的双价抗体, 具有较高的亲和力和较强的穿透能力, 同时血清廓清时间又比较合适, 因此是比较理想的肿瘤放射免疫诊断和治疗载体^[1]。我们已经制备了一株亲和力较好、特异性较高的人源化抗肝癌单链抗体 hscFv₂₅, 该抗体具有良好的靶向定位功能^[2]。我们将 hscFv₂₅ 的连接肽改成 5 肽(GGGGS), 构建人源化抗肝癌双价抗体基因并在大肠杆菌中对该基因进行可溶性表达研究, 目的获得高亲和力的人源化抗肝癌双价抗体(hscFv₂₅)₂, 为进一步的临床应用研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 *E.coli* BL21(DE3)菌株为本室保存。表达载体 pTIG 为军事医学科学院生物工程研究所赵志虎副研究员惠赠, 含促进可溶性表达的伴侣分子硫氧还蛋白基因(Trx), Trx 与下游抗体基因之间引入了翻译终止启动序列 TAAATG。IPTG、琼脂糖、SDS-PAGE 所用材料及限制性内切酶等, 购自 Sigma 公司。Taq DNA 聚合

酶和 T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品。PCR 引物由上海生物工程公司合成, 序列如下: P1: 5' -CGGAATTCTAAATGGAGCTACAGCTGGTTGA ATC-3' (V_H 5' 端引物, 引入 *EcoR* I 酶切位点和终止启动序列 TAAATG); P2: 5' -CAGGAGCTCTGG AACTGGCCTGGCTT-3' (V_H 3' 端引物, 3' 端引入 *SacI* 酶切位点); P3: 5' -CGGAGCTC GGAGGTGGAGGTTCTATGACCCAGACTCC ATCTCC-3' (V_L 5' 端引物, 包含 5 肽 Linker 和引入的 *SacI* 酶切位点); P4: 5' -CCCAAGCTTACGCGTTCC AGCGGA TCCGG-3' (3' 端引物, 于模板上 V_L 3' 端后面的检测标签 E-tag 相配对, 同时引入 *Hind* III 酶切位点)。

1.2 方法

1.2.1 重链可变区(V_H)、含 5 个连接肽的轻链突变体(Linker-V_L-E-tag)基因的 PCR 扩增 以 pTIG-hscFv₂₅-E-tag 为模板, P1 和 P2 为引物, PCR 扩增 V_H 基因片段; 以 P3 和 P4 为引物, PCR 扩增 Linker-V_L-E-tag 基因片段。

1.2.2 重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 的构建 上述 PCR 产物经胶回收后分别用 *EcoR* I、*SacI* 和 *SacI*、*Hind* III 酶切并与 *EcoR* I、*Hind* III 酶切的表达载体 pTIG 大片段进行 3 片段连接, 构建重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂, 转化 *E.coli* BL21(DE3)感受态细菌, 碱裂解法提取质粒并用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 对酶切鉴定阳性克隆进行序列测定。

1.2.3 诱导表达 含重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 的宿主菌 BL21(DE3), 以 IPTG(终浓度为 0.2 mmol/L)于 28 °C 诱导表达 6 h, 离心收集菌体, 超声碎菌。进行 12% SDS-PAGE 及以鼠抗 E-tag 抗体为二抗的 Western blot 鉴定。

1.2.4 可溶性表达产物的纯化 诱导表达 pTIG(hscFv₂₅)₂ 菌体 100 mL, 离心收集菌体, 超声碎菌 15 min 后, 取上清, 用 Ni-NTA Agarose 亲和层析法纯化表达产物(载体多克隆位点下游含 6×His)。表达产物的纯度采用 SDS-PAGE 鉴定, 经核酸蛋白检测仪定量后, 除菌分装, 4 °C 保存备用。

1.2.5 (hscFv₂₅)₂ 的活性的鉴定

1.2.5.1 细胞 ELISA 检测 (hscFv₂₅)₂ 相对亲和力和特异性 SMMC-7721 肝癌细胞及正常肝细胞 HL-02 铺 96 孔板, 经固定和封闭后, 以上述纯化产物(hscFv₂₅)₂ 为一抗(做倍比稀释, 最高终浓度为 20 mg/L), 以鼠抗 E-tag 抗体为二抗, 进行细胞 ELISA, 酶标仪测定 A_{492/630} 值, 达到饱和后的 A_{492/630} 值降低到 50% 时的抗体浓度为 (hscFv₂₅)₂ 的相对亲和力。以亲本单链抗体 hscFv₂₅-E-tag

为平行对照。

1.2.5.2 临床肝癌患者石蜡切片免疫组织化学染色 上述纯化的(hscFv₂₅)₂对60例临床确诊的肝癌、3例肝硬化及2例正常肝的石蜡切片进行常规免疫组织化学染色,显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 的构建 V_H 基因 PCR 扩增片段、Linker-V_L-E-tag PCR 基因扩增片段与 pTIG 表达载体大片段进行 3 片段连接,转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细菌,提取质粒。该质粒经 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切,可切出约 760 bp 大小的片段,与目的基因大小相符,后经序列测定证实序列与设计一致,说明重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 构建成功。

2.2 (hscFv₂₅)₂ 的诱导表达和纯化 将重组 pTIG(hscFv₂₅)₂ 表达载体转化的宿主菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导(以未诱导的同一菌株为对照)表达,碎菌上清进行的 12% SDS-PAGE 显示,约在 *M*_r 30 000 处出现 1 条新生蛋白带(图 1),与目的蛋白的大小相一致,表达量约占细

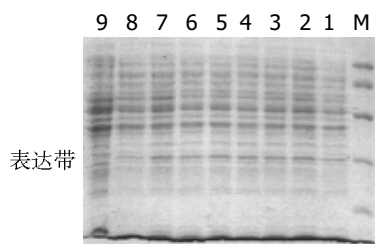


图1 重组(hscFv₂₅)₂表达产物的SDS-PAGE分析。M: 蛋白标记物 *M*_r×10³: 97, 66, 43, 31 和 20; 1-8: 诱导表达不同时间的(hscFv₂₅)₂ 宿主菌碎菌上清。9: 未诱导表达(hscFv₂₅)₂ 宿主菌碎菌上清。

菌裂解上清总蛋白量的 8% 左右,说明是可溶性表达,可溶性表达产物经 Nie 柱(His 亲和层析柱)纯化,纯度达到电泳纯。可溶性表达产物经 Western blot 鉴定,证实为目的基因表达产物。

2.3 表达产物抗体活性的检测 细胞 ELISA 检测结果显示,所纯化的表达产物可与 SMMC-7721 肝癌细胞结合而与正常肝细胞 HL-02 不结合,Diabody 的相对亲和力约为 0.25 mg/L,而亲本单链抗体的相对亲和力约为 2.50 mg/L,即 Diabody 的相对亲和力提高了 10 倍左右。肝癌石蜡切片脱蜡、封闭后,加纯化产物 37 °C 作用 1 h,洗涤三次,加鼠抗 E-tag 抗体(1:2 000),37 °C 作用 1 h,洗涤三次,加 HRP 标记的兔抗鼠抗体,37 °C 作用 30 min 后显色,衬染封片后在显微镜下观察。结果显示,有 45 例为阳性,阳性率为 75%,抗原主要定位于肿瘤细胞膜上,少数病例细胞质或细胞核也呈阳性,癌旁肝、正常肝及肝硬化组织未见阳性着色(图 2),这于亲本单克隆抗体相一致,说明我们所制备的人源化抗肝癌(hscFv₂₅)₂ 较好地保持了亲本抗体的特异性,其相对亲和力比其亲本单链抗体大约高 10 倍。

3 讨论

我国是肝癌高发区,10 a 前的统计数字就显示,我国每年有 11 万人死于肝细胞肝癌,今年来虽未见明确的统计数字,但可以肯定的是其发病率还在呈上升趋势。对于肿瘤的治疗,基因工程抗体再次成为肿瘤诊断和治疗研究的热点。对于实体瘤的体内诊断和治疗,小分子抗体是比较理想的靶向载体,目前已有数株小分子抗体作为放射免疫诊断或治疗载体被批准上市,但尚无肝癌体内诊断性或治疗性抗体上市^[3]。在我国,目

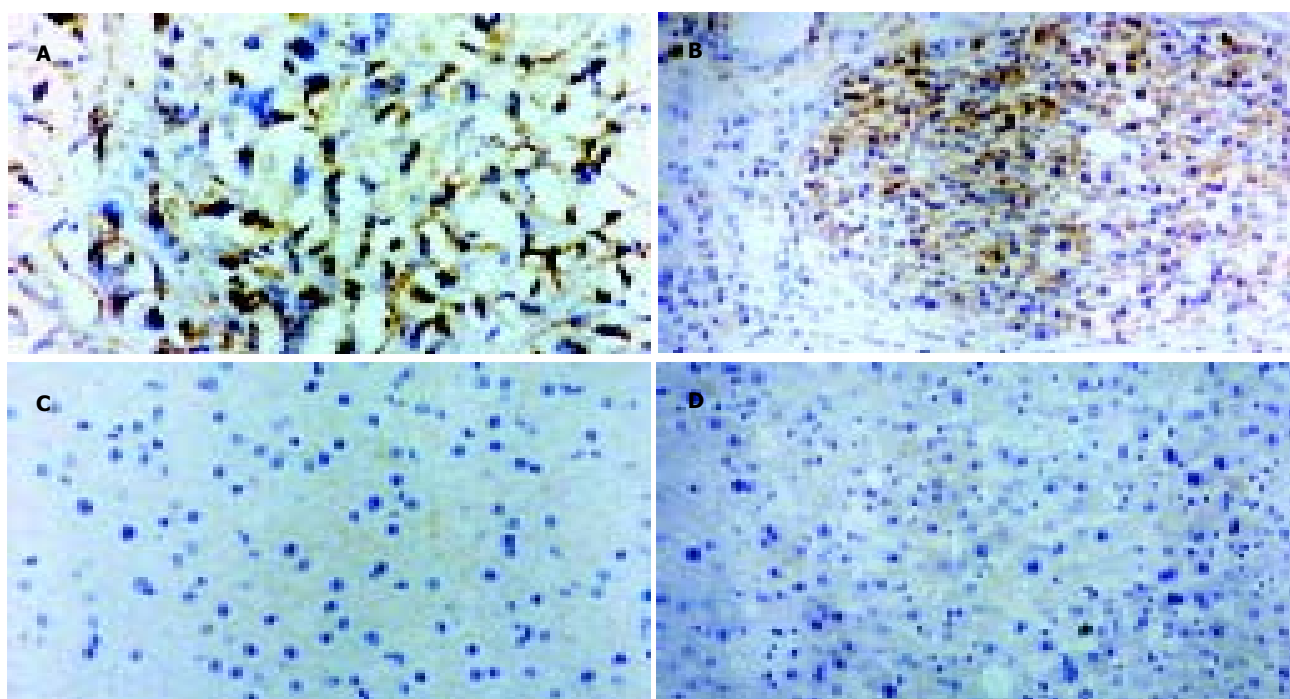


图2 重组表达产物 Diabody 对肝癌组织的免疫组织化学染色(×400)。A-B: Diabody 对肝癌组织的免疫组织化学染色; C: 正常肝的免疫组织化学染色; D: 肝再生结节的免疫组织化学染色。

前有一株同位素标记的,通过全抗体消化而制备的鼠源性抗肝癌抗体片段进入临床研究的报道,在国外还未见类似报道。Diabody具有穿透能力强、亲和力较高和半衰期较合适等特点,同时又具有基因操作简单,容易进行高效表达和大规模生产,因此是比较理想的放射免疫诊断或治疗载体^[2,4]。Diabody是单链抗体通过自然折叠而形成的二聚体形式,两条链间无共价键连接,但和单链抗体一样,轻重链可变区之间也需要连接肽连接,连接肽的长度以5-10个氨基酸为宜,多数报道为5肽,即GGGGS。连接肽长度不宜过长,否则活性蛋白会以单链抗体的形式存在,但也不宜过短,否则活性蛋白会以多聚体的形式存在(三价抗体活四价抗体)^[5-6]。

我们已经制备了一株抗肝癌人源化单链抗体,该抗体与肿瘤坏死因子 α 、PE38等基因融合表达的抗肝癌双功能抗体,对荷肝癌移植裸鼠具有一定的导向杀伤作用^[7],表明单链抗体具有良好的靶向性能,因此我们将该单链抗体改造成Diabody,为应用该型抗体进行临闯肝癌的放射免疫诊断或治疗奠定基础。

4 参考文献

- 1 Yazaki PJ, Wu AM, Tsai SW, Williams LE, Ikler DN, Wong JY, Shively JE, Raubitschek AA. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and T84.66 minibody: comparison to radiolabeled fragments. *Bioconjug Chem* 2001;12:220-228
- 2 张静, 刘彦仿, 杨守京, 孙志伟, 乔庆, 张素珍. 抗肝癌单链抗体融合人突变型TNF α 的构建与表达. *世界华人消化杂志* 2000;8: 616-620
- 3 陈惠鹏. 医药生物工程进展. 北京: 人民军医出版社, 2004:89-108
- 4 Tahtis K, Lee FT, Smyth FE, Power BE, Renner C, Brechbiel M W, Old LJ, Hudson PJ, Scott AM. Biodistribution properties of (111)indium-labeled C-functionalized trans-cyclohexyl diethylenetriaminepenta acid humanized 3S193 diabody and F(ab')₂ constructs in a breast carcinoma xenograft model. *Clin Cancer Res* 2001;7:1061-1072
- 5 Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR, Hudson PJ. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Meth* 2001;248:47-66
- 6 Wu AM, Chen W, Raubitschek A, Williams LE, Neumaier M, Fischer R, Hu SZ, Odom-Maryon T, Wong JY, Shively JE. Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 1996;2:21-26
- 7 孙志伟, 刘彦仿, 袁清安, 俞伟源, 黄翠芬, 马兰花, 于继云. 抗肝癌人源化单链抗体融合肿瘤坏死因子 α 的导向作用. *中华肝脏病杂志* 2000;8:352-355

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

应用基因芯片技术筛查大肠癌相关基因

南清振, 张振书, 杨希山, 肖冰, 高蕾, 叶方鹏, 武金保

南清振, 张振书, 杨希山, 肖冰, 高蕾, 叶方鹏, 武金保, 南方医科大学附属南方医院消化研究所 广东省广州市 510510
国家自然科学基金资助项目, No.39970825
项目负责人: 南清振, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医科大学附属南方医院消化研究所. nanqzh@fimmu.com
收稿日期: 2004-08-31 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 筛选与大肠癌相关的差异表达基因。

方法: 用包含8 000个cDNA的基因芯片法检测4例大肠高分化腺癌组织及其癌旁正常肠黏膜组织标本RNA表达谱, 通过对比分析寻找与大肠癌相关的基因。

结果: 大肠癌差异表达基因中有1 807个基因发生了显著性变化, 其中上调表达的基因有936个, 最有显著上调的有36个; 下调表达的基因有871个, 最有显著下调的有30个。

结论: 大肠癌的发生是一个多基因表达失调的过程, 大肠癌与癌旁正常肠黏膜组织间存在差异表达的基因。

南清振, 张振书, 杨希山, 肖冰, 高蕾, 叶方鹏, 武金保. 应用基因芯片技术筛查

大肠癌相关基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2742-2744
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2742.asp>

0 引言

随着人类基因组计划的开发研究和分子生物学、分子遗传学的迅速发展成熟, 人类对肿瘤的认识已进入分子水平^[1]。寻找大肠癌相关基因, 深入了解该相关基因在肿瘤发生及转移过程中的作用已成为可能。基因芯片技术适用于大规模的基因检测和基因功能的研究、疾病发生机制的研究及临床诊断等方面^[2-4]。本研究系选用有8000条人类基因的cDNA表达谱芯片, 以临床切除的大肠癌及癌旁正常肠黏膜组织标本为研究对象, 筛查大肠癌发生、发展过程中与肿瘤相关的基因, 为大肠癌的早期诊断与治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003年收治的4例大肠高分化腺癌患者组织标本和其对应癌旁5 cm以上的正常大肠黏膜组织。

标本切除后立即置于液氮,冻存备用。TRIzol试剂购自Life Technologies公司,dNTP购自Promega公司;Taq酶购自上海生物工程服务公司;逆转录酶及缓冲液购自Gibco公司;荧光素3标记的脱氧尿嘧啶三磷酸(Cy3 dUTP)、荧光素标记的5脱氧尿嘧啶三磷酸(Cy5 dUTP)购自美国Amersham Pharmacia公司;总RNA提取试剂盒购自德国Qiagen公司。芯片类型(微芯公司基因表达谱芯片CSC-GE-80),Gen III Microarray Spotter芯片点样仪购自Amersham Pharmacia公司;恒温杂交箱购自Shellab公司;芯片扫描仪购自Amersham Pharmacia公司;聚合酶链反应(PCR)仪购自MJ Research公司;扫描图像显示用软件为ImageQuant (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd);扫描图像分析用软件为ArrayVision (Imaging Research, Ltd)。芯片实验数据分析软件为MIDAS(Chipscreen Biosciences, Ltd)。

1.2 方法 按一步法抽提、纯化大肠癌及正常大肠组织的总RNA。用无RNA酶的三蒸水溶解沉淀,紫外分光分析及电泳检测显示,获得高质量的总RNA。参照Draghici *et al*^[9]方法进行逆转录标记cDNA探针并纯化。在链合成中掺入荧光素标记的dUTP,用Cy3 dUTP标记正常组织mRNA,用Cy5 dUTP标记大肠癌组织mRNA。检测标记的荧光含量。用分光光度计检测260 nm, 550 nm, 650 nm时的A值,然后计算出荧光含量。将标记好的探针(Cy3/Cy5)按等量混匀,溶解在30 μ L的杂交缓冲液中。将芯片和杂交混合探针分别置于95 $^{\circ}$ C双蒸水浴中变性5 min,立即将混合探针加在芯片上,封片(不能留有气泡),置杂交舱,密闭,42 $^{\circ}$ C孵箱恒温杂交16 h,洗片,晾干。玻片完全干燥后,放入扫描片夹中,利用扫描仪进行扫描;扫描后将图像转化为基于荧光强度的数字信号,随后进行数据分析和处理。用以下3个条件作为判定基因差异表达的标准:(1)Cy3和Cy5信号的比值相差2倍(上调Cy3/Cy5 >2.0或下调<0.5)以上;(2)Cy3或Cy5, Cy3和Cy5信号值其中之一必须>600;(3)聚合酶链反应实验结果良好。同时要求筛选出的内对照基因表达数据在所有标本中重复^[6-9]。

2 结果

大肠癌组织 A_{260}/A_{280} 值达1.85,而癌旁正常肠黏膜组织的 A_{260}/A_{280} 值1.96,电泳结果证实高纯化的总RNA。部分基因芯片杂交结果及所有基因点CY3/CY5信号强度散点图(图1, 2)。用微矩阵基因芯片筛选4例大肠癌和癌旁正常肠黏膜组织的差异表达的基因,按照我们的数据筛选标准,芯片结果中有1 807个基因发生了显著性变化,其中上调表达的基因有936个,最有显著性上调的有36个;下调表达的基因有871个,最有显著性下调的有30个。筛选出的有显著差异性的基因按照功能进行分类可以发现他们涉及到细胞生长的各个方面,包括细胞增生,细胞凋亡,细胞代谢以及细胞骨架结构,同时还涉及到各种原癌基因和肿瘤抑制基因的表达

变化。这反映了肿瘤生长过程涉及到各方面的基因表达变化。

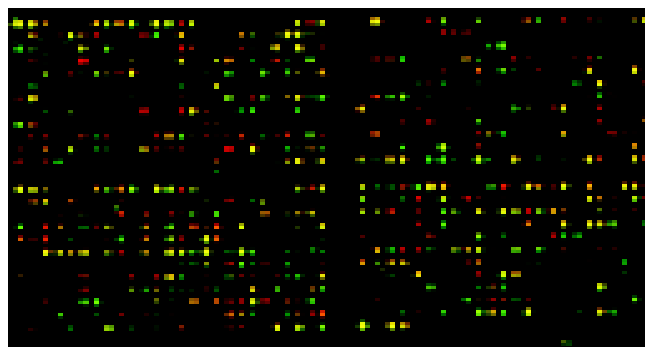


图1 部分基因芯片杂交双色荧光标记叠加图。Cy3标记正常大肠黏膜的总RNA作为对照组,Cy5标记大肠癌的总RNA作为实验组,分别与芯片杂交后进行双色荧光叠加。对于某一点的两种叠加荧光信号,如果Cy3信号较强,该点多显示绿色(下调);如果Cy5信号较强,该点多显示红色(上调);如果强度相似,即显示黄色。

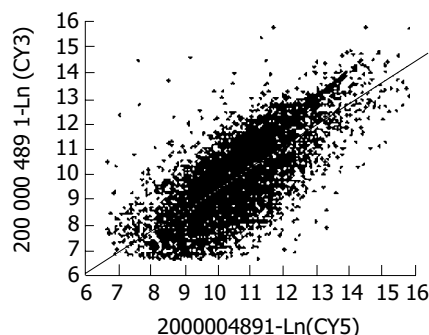


图2 所有基因点CY3/CY5杂交信号强度散点图。X轴、Y轴分别以Cy3荧光强度值和Cy5荧光强度值为坐标,每一个数据点代表芯片上一个基因杂交信号。

3 讨论

我们采用的微矩阵基因芯片是以微芯基因科技公司的8 000条基因为靶基因,制备成cDNA芯片,以临床切除的大肠癌及正常大肠黏膜标本为研究对象,对这两种组织总RNA逆转录产生的cDNA进行杂交检测,寻找和筛查大肠癌相关基因,探讨大肠癌在发生、发展过程中各种基因的表达变化,为大肠癌的早期诊治提供理论依据。软件统计分析微矩阵扫描结果提示,大肠癌发生中有众多基因发生了分子生物学改变(个体差异存在不同),其中有1 807个基因发生了显著性变化,上调表达的基因有936个,最有显著性上调的有36个;下调表达的基因有871个,最有显著性下调的有30个。而且发现在大肠癌的发生、发展中有多种基因的参与,他们涉及到细胞生长的各个方面,包括细胞增生,细胞凋亡,细胞代谢以及细胞骨架结构,同时还涉及到各种原癌基因和肿瘤抑制基因的表达变化。证实大肠癌中基因改变的多样性,进一步推断肿瘤的发生、发展是一多基因、多阶段过程^[10-12]。

由于肿瘤部位所包含的细胞类型的多样性,使得人们在解释这些相关基因的表达变化与肿瘤中特定细

胞类型的表型变化的相关性时遇到一定的困难.但是对于那些有非常明显变化的基因和主要的细胞类型间的相关性仍然可以在进一步的研究中得到明确^[13-15].我们按照相关的功能挑选了部分基因可以看出一些与肿瘤相关的基因表达变化,如细胞凋亡相关基因的下调表达,但是同时也注意到一些细胞凋亡启动基因的表达上调,这其中可能反映了肿瘤对抗细胞凋亡的内在机制^[16-17];而在原癌基因方面,大部分发生了表达上调,但是也有部分表达下调,这可能与不同原癌基因在不同肿瘤发生中的作用不同有关;其他如细胞骨架蛋白相关基因的表达变化则与肿瘤细胞的生长和转移特性密切相关^[18].

4 参考文献

- 1 南清振,高蕾,杨希山,肖冰,周京旭,张亚历,施理. mRNA差异显示法筛选大肠癌相关基因. 第一军医大学学报 2001;21:258-261
- 2 纪冬,成军,刘妍,王建军,郭江. 应用基因表达谱芯片技术筛选NS3TP1转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12:1707-1711
- 3 岑辉,唐小萍,韩英,曾晓,吴岚军,方永明. 低密度基因芯片的性能与应用. 中国医学检验杂志 2004;5:8-11
- 4 Man XB, Tang L, Qiu XH, Yang LQ, Cao HF, Wu MC, Wang HY. Expression of cytochrome P4502E1 gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1565-1568
- 5 Draghici S, Kulaeva O, Hoff B, Petrov A, Shams S, Tainsky MA. Noise sampling method: an ANOVA approach allowing robust selection of differentially regulated genes measured by DNA microarrays. *Bioinformatics* 2003;19:1348-1359
- 6 Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* 2002;3:research0062
- 7 成军,刘妍,洪源,王建军,杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白3反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 8 刘妍,成军,王春花,杨倩,王建军,纪冬. 基因表达谱芯片技术筛选XTP4基因转染细胞差异表达基因. 胃肠病学和肝病学杂志 2004;13:209-213
- 9 Li SR, Dorudi S, Bustin SA. Identification of differentially expressed genes associated with colorectal cancer liver metastasis. *Eur Surg Res* 2003;35:327-336
- 10 盛剑秋,晨智敏. 大肠癌相关基因对大肠癌的筛选. 世界华人消化杂志 2001;9:783-785
- 11 潘胜武,孙安乐,刘变英,崔大祥,闫小君,栗彤,雷宇锋,王胜. 大肠癌相关基因表达的早期诊断意义. 世界华人消化杂志 2000;8:1431-1432
- 12 Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, Orntoft TF. Classification of Dukes'B and C colorectal cancers using expression arrays. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:263-271
- 13 陈尧,周总光. 基因表达谱芯片在筛选直肠癌转移相关基因中的应用. 中华胃肠外科杂志 2004;7:137-139
- 14 Gupta V, Cherkassky A, Chatis P, Joseph R, Johnson AL, Broadbent J, Erickson T, DiMeo J. Directly labeled mRNA produces highly precise and unbiased differential gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e13
- 15 Skubitz KM, Skubitz AP. Gene expression in aggressive fibromatosis. *J Lab Clin Med* 2004;143:89-98
- 16 Kluger HM, Kluger Y, Gilmore-Hebert M, DiVito K, Chang JT, Rodov S, Mironenko O, Kacinski BM, Perkins AS, Sapi E. cDNA microarray analysis of invasive and tumorigenic phenotypes in a breast cancer model. *Lab Invest* 2004;84:320-331
- 17 Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 2003;9:931-946
- 18 Ognjanovic S, Tashima LS, Bryant-Greenwood GD. The effects of pre-B-cell colony-enhancing factor on the human fetal membranes by microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:1187-1195

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

慢性萎缩性胃炎患者血清骨桥蛋白的变化

邢晓静, 官月华, 袁媛

邢晓静, 官月华, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001
国家“十五”科技攻关项目资助, No. 2001BA703B06(B)
项目负责人: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路 92 号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室. yyuan@mail.com.edc.cn
电话: 024-23256666-6153
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-08-30

摘要

目的: 探讨血清骨桥蛋白(osteopontin, OPN)水平与慢性萎

缩性胃炎之间的关系。

方法: 慢性萎缩性胃炎患者 42 名, 正常人 38 名, 胃癌患者 42 例应用酶联免疫技术(ELISA 法)检测血清 OPN 表达情况。

结果: 慢性萎缩性胃炎患者血清 OPN 水平($25.0 \pm 2.8 \mu\text{g/L}$) 低于正常人($41.4 \pm 7.5 \mu\text{g/L}$), 低于胃癌患者血清 OPN 水

平($78.9 \pm 44.5 \mu\text{g/L}$), 三者相比差异均有统计学意义($P < 0.01$). 血清OPN水平与慢性萎缩性胃炎患者的性别、年龄无相关性($P > 0.05$).

结论: 慢性萎缩性胃炎患者血清OPN明显下降.

邢晓静, 宫月华, 袁媛. 慢性萎缩性胃炎患者血清骨桥蛋白的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2744-2746
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2744.asp>

0 引言

慢性萎缩性胃炎指慢性胃膜炎性病变累及胃膜腺体萎缩. 作为在胃癌演变中一个最重要的癌前疾病与胃癌的发生关系密切, 是胃癌的病变基础. 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种有多种功能的分泌型钙结合磷酸化糖蛋白. 可由多种细胞分泌, 普遍认为 OPN 与肿瘤的发生, 发展关系密切, 能够促进肿瘤的浸润转移, 反映肿瘤的恶性程度. 而近来亦有不同意见认为, OPN 与肿瘤的发生相关而非转移相关. 肿瘤的防治是当前医学迫切需要解决的问题, 癌前疾病的早期发现对肿瘤的防治意义重大, 寻求新的有意义的筛查指标是其中的重要研究方向. 目前, 尚无 OPN 与萎缩性胃炎关系的报道.

我们检测血清 OPN 在正常人、慢性萎缩性胃炎和胃癌患者中的表达情况, 探讨血清中 OPN 水平与慢性萎缩性胃炎之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 辽宁省庄河地区正常人 38 名, 男 18 名, 女 20 名, 年龄 34-79(平均 51 岁); 慢性萎缩性胃炎患者 42 例, 男 21 例, 女 21 例, 年龄 24-72(平均 54 岁); 胃癌患者 42 例来自中国医科大学附属第一医院肿瘤科、中国医科大学附属第二医院普外科: 男 23 例, 女 19 例, 年龄 36-78(平均 57 岁), 全部病例均经病理诊断确诊, 均为未经治疗患者. 采集受试对象空腹外周静脉血, 分离血清, -80°C 放置备用.

1.2 方法 应用血清 OPN 抗体 ELISA 检测试剂盒(美国 Assay Disigns 公司)检测血清 OPN 水平. 全部操作均严格按照试剂盒操作说明书进行, 应用 Multiskan Ascent 自动酶标仪(芬兰 Labsystems 公司)空白孔调零, 在 450 nm 波长下读取吸光度值, 根据标准曲线得出 OPN 浓度. 实验中所有样品及标准品均双份检测.

统计学处理 采用 t 检验及(s)方差分析, 应用统计软件 SPSS10.0 处理.

2 结果

慢性萎缩性胃炎患者血清 OPN 浓度平均为 $25.0 \pm 2.8 \mu\text{g/L}$, 正常人为 $41.4 \pm 7.5 \mu\text{g/L}$, 胃癌患者为 $78.9 \pm 44.5 \mu\text{g/L}$. 慢性萎缩性胃炎患者血清 OPN 显著低于正常人及胃癌患者($P < 0.01$). 慢性萎缩性胃炎患者性别、年龄与血清 OPN 表达无相关性($P > 0.05$, 图 1).

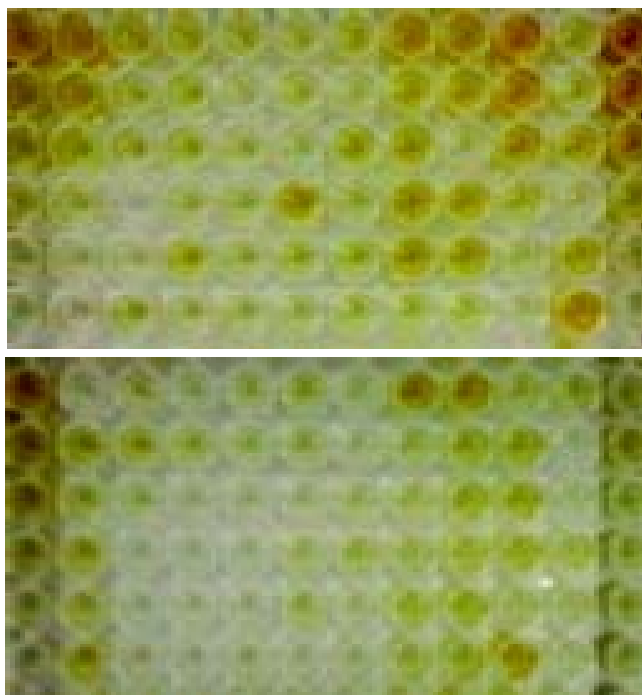


图1 骨桥蛋白 ELISA 检测. 无色或极浅色者为阴性, 棕黄色为阳性.

3 讨论

慢性萎缩性胃炎作为慢性胃炎的一种, 因其与胃癌的发生关系密切, 较其他疾病发生胃癌的频率高, 是胃癌的病变基础, 为胃癌的癌前疾病, 受到较多关注. 流行病学资料表明胃癌高发区慢性萎缩性胃炎的发病率明显高于低发区^[1-4]. OPN 是一种有多种功能的分泌型糖蛋白, 在体内以游离状态和结合状态两种形式存在, 在多种体液中均可检测得到. OPN 含多个酪氨酸蛋白激酶介导的磷酸化部位和糖基化部位, 多种激酶对 OPN 发生磷酸化的部位不同是其发挥不同的功能的原因之一. OPN 作为多功能蛋白质, 对肿瘤生长的诸多方面均有影响, 参与细胞的信号传导; 参与细胞外基质的迁移和体外形成毛细血管样管道, 抑制 p53 活性, 影响机体非特异性应答^[5-13]. Chang *et al*^[14]报道, 体外由 TPA 诱发的癌性生长可被 OPN 抗体所抑制, 其认为体外诱导中 OPN 必不可少. Takahashi *et al*^[15]报道成纤维母细胞瘤的 OPN 转染体在老鼠体内可显著诱导新血管生成. Terashi *et al*^[16]认为 OPN 水平的低表达与肝胆管癌的进展和临床结论相关. OPN 参与癌基因对细胞的转染, 同时抑制抑癌基因活性, 抑制增生细胞凋亡从而发挥其作为增生细胞标志蛋白的作用^[17]等. 我们在慢性萎缩性胃炎患者组中, 血清 OPN 水平明显低于正常人组和胃癌患者组($P < 0.01$), 可能是在慢性萎缩性胃炎中, 其胃黏膜层变薄, 胃黏膜内固有腺管萎缩, 黏膜表面上皮细胞及胃小凹上皮细胞脱落, 从而 OPN 分泌减少, 分泌入血清的 OPN 同样减少, 导致在慢性萎缩性胃炎患者中表达下降, 血清 OPN 值降低.

当前, 肿瘤的防治仍是医学界迫切需要解决的问题. 对人群进行有计划的、定期的普查, 不仅可以及

时发现已患肿瘤的患者,为早治提供有利的条件,而且可以及早查出癌前疾病(病变)的患者并予以适当的处置,这对预防癌症的发生、发展有着重要的意义。因此,寻求新的、有意义的监测指标意义重大。Van Heek *et al*^[18]以 Affymetrix 人类基因组 U133 标记基因分析 235 例基因片段,认为血清 OPN 测定优于基因片段分析,血清 OPN 测定可作为恶性疾病筛查指标之一。本实验发现血清 OPN 水平在胃良、恶疾病以及正常人群之间存在明显的差异,结果提示血清 OPN 水平可能对慢性萎缩性胃炎有预警作用,血清 OPN 水平降低的人群可能是慢性萎缩性胃炎的高发人群。血清 OPN 水平可作为鉴别胃癌及癌前疾病的良好的标志物。今后有必要进一步扩大样本例数及癌前疾病的种类,进行更深入研究。

4 参考文献

- 1 Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, Uwaifo AO, Otegbayo JA, Ola SO, Coker AO. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol* 2004;10:1958-1960
- 2 Yang GF, Deng CS, Xiong YY, Gong LL, Wang BC, Luo J. Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: Association with *Helicobacter pylori* cagA (+) infection. *World J Gastroenterol* 2004;10:491-496
- 3 Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD. Anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *H pylori* infection in patients with precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2003;9:755-758
- 4 Yin GY, Zhang WN, Shen XJ, Chen Y, He XF. Ultrastructure and molecular biological changes of chronic gastritis, gastric cancer and gastric precancerous lesions: a comparative study. *World J Gastroenterol* 2003;9:851-857
- 5 Gao C, Guo H, Downey L, Marroquin C, Wei J, Kuo PC. Osteopontin-dependent CD44v6 expression and cell adhesion in HepG2 cells. *Carcinogenesis* 2003;24:1871-1878
- 6 Gao C, Guo H, Wei J, Kuo PC. Osteopontin inhibits expression of cytochrome c oxidase in RAW 264.7 murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:120-125
- 7 Zhang GX, Zhao ZQ, Wang HD, Hao B. Enhancement of osteopontin expression in HepG2 cells by epidermal growth factor via phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *World J Gastroenterol* 2004;10:205-208
- 8 Mangum J, Bermudez E, Sar M, Everitt J. Related Articles, Links Osteopontin expression in particle-induced lung disease. *Exp Lung Res* 2004;30:585-598
- 9 Gao C, Mi Z, Guo H, Wei J, Wai PY, Kuo PC. Related Articles, Links A transcriptional repressor of osteopontin expression in the 4T1 murine breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:1010-1016
- 10 Mi Z, Guo H, Wai PY, Gao C, Wei J, Kuo PC. Related Articles, Links Differential osteopontin expression in phenotypically distinct subclones of murine breast cancer cells mediates metastatic behavior. *J Biol Chem* 2004;279:46659-46667
- 11 Marroquin CE, Downey L, Guo H, Kuo PC. Related Articles, Links Osteopontin increases CD44 expression and cell adhesion in RAW 264.7 murine leukemia cells. *Immunol Lett* 2004;95:109-112
- 12 Iguchi S, Nishi S, Ikegame M, Hoshi K, Yoshizawa T, Kawashima H, Arakawa M, Ozawa H, Gejyo F. Related Articles, Links Expression of osteopontin in cisplatin-induced tubular injury. *Nephron Exp Nephrol* 2004;97:96-105
- 13 Nagatomo T, Ohga S, Takada H, Nomura A, Hikino S, Imura M, Ohshima K, Hara T. Related Articles, Links Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. *Clin Exp Immunol* 2004;138:47-53
- 14 Chang PL, Cao M, Hicks P. Osteopontin induction is required for tumor promoter-induced transformation of preneoplastic mouse cells. *Carcinogenesis* 2003;24:1749-1758
- 15 Takahashi F, Akutagawa S, Fukumoto H, Tsukiyama S, Ohe Y, Takahashi K, Fukuchi Y, Saijo N, Nishio K. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice. *Int J Cancer* 2002;98:707-712
- 16 Terashi T, Aishima S, Taguchi K, Asayama Y, Sugimachi K, Matsuura S, Shimada M, Maehara S, Maehara Y, Tsuneyoshi M. Decreased expression of osteopontin is related to tumor aggressiveness and clinical outcome of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Liver Int* 2004;24:38-45
- 17 Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of Osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:723-749
- 18 Van Heek NT, Maitra A, Koopmann J, Fedarko N, Jain A, Rahman A, Iacobuzio-Donahue CA, Adsay V, Ashfaq R, Yeo CJ, Cameron JL, Offerhaus JA, Hruban RH, Berg KD, Goggins M. Gene expression profiling identifies markers of ampullary adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 2004;3:651-656

乌斯他丁对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用

李旭, 石力, 赵碧, 田伏洲, 黄大熔

李旭, 石力, 田伏洲, 黄大熔, 成都军区总医院全军普外中心
四川省成都市 610083
赵碧, 成都军区总医院临床实验科 四川省成都市 610083
项目负责人: 田伏洲, 610083, 四川省成都市, 成都军区总医院全军普外中心, lishi@mail.sc.cninfo.net
收稿日期: 2004-07-28 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 观察乌斯他丁(ulinastatin, UTI)对急性胰腺炎大鼠肝脏核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的抑制及其对肝损伤的损伤保护作用。

方法: Wistar 大鼠 72 只, 随机分为: 急性胰腺炎组(AP), 急性胰腺炎UTI治疗组(APU)和假手术组(SO). 分别于术后 3, 6, 12, 24 h 检测肝组织中 NF- κ B 活性、血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平。

结果: SO 组术后未见 NF- κ B 活化, 血浆 ALT 及肝脏病理无显著变化. 与 SO 组相比, AP 组术后 3, 6 h NF- κ B 活性(积分灰度)显著增加(3.13 ± 0.57 vs 0.71 ± 0.10 , 1.92 ± 0.26 vs 0.67 ± 0.11 , $P < 0.01$), 血浆 ALT 在 3-24 h 也显著高于 SO 组(1.1 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.09 , 1.6 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.1 , 2.4 ± 0.4 vs 0.7 ± 0.09 , 3.5 ± 0.7 vs 0.8 ± 0.1 , $P < 0.01$). APU 组 NF- κ B 活性在 3, 6 h 后显著低于 AP 组(2.26 ± 0.41 vs 3.13 ± 0.57 , 1.56 ± 0.23 vs 1.92 ± 0.26 , $P < 0.01$), 血浆 ALT 较 AP 组在 6, 12, 24 h 后也有了显著下降(1.2 ± 0.2 vs 1.6 ± 0.2 , 1.8 ± 0.3 vs 2.4 ± 0.4 , 2.5 ± 0.5 vs 3.5 ± 0.7 , $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$).

结论: UTI 能够抑制 NF- κ B 活化, 对急性胰腺炎大鼠肝损伤具有保护作用。

李旭, 石力, 赵碧, 田伏洲, 黄大熔. 乌斯他丁对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2747-2749
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2747.asp>

0 引言

急性胰腺炎肝损伤发生过程中, 有着许多炎症因子的参与^[1-2]. 而核因子 κ B 则是一类主要参与机体炎症分子表达调控的转录因子^[3-5], 他参与了急性胰腺炎肝损伤发生过程^[6]. 我们观察了大鼠急性胰腺炎发生时, 乌斯他丁(UTI)对 NF- κ B 活化的抑制作用以及由此而产生的对肝损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠 72 只, 雌雄不限, 体质量 200-250 g, 随机分为 3 组: (1)急性胰腺炎组(AP 组, 24 只);

用 3 g/L 戊巴比妥钠 ip 麻醉(10 mL/kg), 上腹部正中切口入腹, 经十二指肠穿刺胆管成功后, 以无创血管夹阻断肝门部胆管, 向胰管内逆行注入 50 g/L 牛磺胆酸钠(1 mL/kg), 注射完毕后松开血管夹, 关腹, 皮下注射生理盐水 2 mL, 以补充术中丢失水分. (2)急性胰腺炎 UTI 治疗组(APU 组, 24 只): 诱导胰腺炎前 1 h ip UTI (10 万 u/kg). (3)假手术组(SO 组, 24 只): 操作方法同 1, 但不向胰管内注入牛磺胆酸钠. 各组分别在术后 3, 6, 12, 24 h 再次开腹, 经下腔静脉采血约 5 mL, 置于肝素钠抗凝瓶中, 离心(2 000 r/min, 1 min), 取上清冻存; 并取大小约 0.5 cm³ 肝中叶组织二块, 一块浸泡于 40 g/L 多聚甲醛中, 另一块置于液氮中保存。

1.2 方法

1.2.1 肝组织 NF- κ B 活性 参照文献介绍的方法对肝组织进行核蛋白提取, 并用考马斯亮蓝测定蛋白浓度, 调蛋白浓度为 0.5 μ g/L 后置于 -70 $^{\circ}$ C 保存. 以 γ -³²P 在 T₄ 激酶的作用下标记 NF- κ B 探针, 探针序列为 5' -AGT GAGGGGACTTTCCAGGC-3'. 将标记的探针同肝组织核蛋白进行结合后, 置于非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳并进行放射自显影, 用凝胶扫描分析仪对显影结果进行分析, 以积分灰度值表示 NF- κ B 的活性变化。

1.2.2 血浆丙氨酸氨基转移酶 用自动生化分析仪(Beckman CX7)进行 ALT 检测。

统计学处理 结果以 mean \pm SD 表示, 组间行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著意义; $P < 0.01$ 为差异有极显著意义。

2 结果

2.1 肝组织 NF- κ B 活性 除 SO 组外, 其余 2 组在术后 3 h, 肝组织中 NF- κ B 存在显著活化, 6 h 后活化程度下降, 但仍显著高于 SO 组($P < 0.01$), 术后 12 h NF- κ B 活化程度则明显下降, 同 SO 组相比无显著差异($P > 0.05$), 至 24 h 活化消失. 其中 AP 组 NF- κ B 活化程度在 3-6 h 均显著高于 APU 组($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 急性胰腺炎大鼠肝组织 NF- κ B 活性的积分灰度值(mean \pm SD, $n = 24$)

分组	<i>t</i> (术后) / h		
	3	6	12
AP	3.13 ± 0.57	1.92 ± 0.26	0.8 ± 0.12
APU	2.26 ± 0.41^b	1.56 ± 0.23^b	0.75 ± 0.10
SO	0.71 ± 0.10	0.67 ± 0.11	0.69 ± 0.11

^b $P < 0.01$ vs AP, SO 组。

2.2 血浆 ALT SO 组 ALT 术后无明显变化 AP 及 APU 组 ALT 在术后 3–24 h 均呈持续性上升, 显著高于 SO 组 ($P < 0.01$). 但 6 h 后 APU 组 ALT 明显低于 AP 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 2).

表 2 急性胰腺炎大鼠血浆 ALT (mean \pm SD, $n = 24$, kat/L)

分组	t (术后)/h			
	3	6	12	24
AP	1.1 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	2.4 \pm 0.4	3.5 \pm 0.7
APU	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2 ^a	1.8 \pm 0.3 ^d	2.5 \pm 0.5 ^d
SO	0.7 \pm 0.09 ^b	0.7 \pm 0.1 ^b	0.7 \pm 0.09 ^b	0.8 \pm 0.1 ^b

^b $P < 0.01$ vs AP 和 APU 组; ^a $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ s AP 组.

3 讨论

急性胰腺炎常合并全身多脏器功能损害, 而肝脏则是最常受累的器官之一, 急性胰腺炎所引起的肝损害不但可以加重胰腺炎病情, 肝功能的好坏还直接关系到其他脏器并发症的出现与否. 核因子 κ B 是一类能与某些基因启动子及增强子区的 κ B 序列结合的蛋白质, 他能启动或增强这些基因的转录^[7–9]. 在静息的细胞中, NF- κ B 以无活性的形式存在于细胞质之中, 当受到一定的刺激后, NF- κ B 发生活化, 活化的 NF- κ B 于是发生核易位, 同靶基因启动子或增强子上的 κ B 结合位点, 从而启动或增强这些基因的转录^[10–13]. 研究表明, NF- κ B 可以促进与炎症有关的多种基因的转录^[14–19], 从而参与多种原因引起的组织损伤过程^[20–25]. 在急性胰腺炎发生过程中, 肝组织中 NF- κ B 发生了显著活化, 活化的 NF- κ B 参与了肝损伤的发生^[6].

乌斯他丁是一种从人的尿液中提取出来的蛋白多肽, 它具有抑制多种酶活性、清除氧自由基、抑制炎症递质释放的作用. Itabashi *et al*^[26]发现, 乌斯他丁能够抑制肝脏 ICAM-1 以及 CNCI 表达, 降低血浆 TNF- α 浓度. Aosasa *et al*^[27]则证明乌斯他丁可以抑制 LPS 刺激下的单核细胞 NF- κ B 的激活, 降低 TNF- α 表达. 本实验结果显示, APU 组在术后 3–6 h NF- κ B 活化程度显著低于 AP 组, 与此同时, 血浆 ALT 在术后 6–24 h 也显著低于 AP 组. 这就说明 UTI 对急性胰腺炎肝损伤具有保护作用, 其产生作用的机制可能与抑制 NF- κ B 活化有关.

4 参考文献

- Jaffray C, Yang J, Norman J. Elastase mimics pancreatitis-induced hepatic injury via onflammatory mediators. *J Surg Res* 2000;90:95-101
- Hori Y, Takeyama Y, Ueda T, Shinkai M, Takase K, Kuroda Y. Macrophage-derived transforming growth factor- β 1 induces hepatocellular injury via apoptosis in rats severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000;127:641-469
- Li YY, Gao ZF. Acute pancreatitis and NF- κ B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:420-421
- Suk K, Yeou Kim S, Kim H. Regulation of IL-18 production by

- IFN gamma and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF- κ B pathway in the regulatory processes. *Immunol Lett* 2001;77:79-85
- Izumi T, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Li Y, Takemura G, Fujiwara H, Garbers DL, Mochizuki S, Nakao K. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF- κ B activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2001;108:203-213
- Shi L, Huang DR, Tian FZ, Wang Y, Ma JX, Li XJ, Yin ZL. The relationship between hepatic NF- κ B activation and liver injury in rats with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:554-557
- Antonelli A, Bianchi M, Crinelli R, Gentilini L, Magnani M. Modulation of ICAM-1 expression in ECV304 cells by macrophage-released cytokines. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:978-991
- Ginis I, Jaiswal R, Klimanis D, Liu J, Greenspon J, Hallenbeck JM. TNF-alpha-induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF- κ B transactivation: the role of NF- κ B association with p300 adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:142-152
- Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance IK, Hall G, Cross AS, Rogers TB. Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF- κ B activation and tumor necrosis factor-alpha expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H872-879
- Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, Evans AJ, Wedin KE, Michael LH, Entman ML. Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia. *Am J Pathol* 2001;159:1301-1311
- Moine P, McIntyre R, Schwartz MD, Kaneko D, Shenkar R, Le Tulzo Y, Moore EE, Abraham E. NF- κ B regulatory mechanisms in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Shock* 2000;13:85-91
- Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:307-314
- Omoya T, Shimizu I, Zhou Y, Okamura Y, Inoue H, Lu G, Itonaga M, Honda H, Nomura M, Ito S. Effects of idoxifene and estradiol on NF- κ B activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver* 2001;21:183-191
- Altavilla D, Saitta A, Guarini S, Galeano M, Squadrito G, Cucinotta D, Santamaria LB, Mazzeo AT, Campo GM, Ferlito M, Minutoli L, Bazzani C, Bertolini A, Caputi AP, Squadrito F. Oxidative stress causes nuclear factor-kappaB activation in acute hypovolemic hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1055-1066
- Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock* 2002;17:114-119
- Wang Z, Castresana MR, Detmer K, Newman WH. An IkappaB-alpha mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Surg Res* 2002;102:198-206
- Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, Luft FC. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2002;2:3
- Helin E, Vainionpaa R, Hyypia T, Julkunen I, Matikainen S. Measles virus activates NF- κ B and STAT transcription factors and production of IFN-alpha/beta and IL-6 in the human lung epithelial cell line A549. *Virology* 2001;290:1-10
- Zhang XY, Shimura S, Masuda T, Saitoh H, Shirato K. Antisense oligonucleotides to NF- κ B improve survival in bleomycin-induced pneumopathy of the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(4 Pt 1):1561-1568
- Ross SD, Kron IL, Gangemi JJ, Shockey KS, Stoler M, Kern JA, Tribble CG, Laubach VE. Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L528-536

- 21 Jaffray C, Yang J, Carter G, Mendez C, Norman J. Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery* 2000;128:225-231
- 22 Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000;106:867-872
- 23 Kono H, Wheeler MD, Rusyn I, Lin M, Seabra V, Rivera CA, Bradford BU, Forman DT, Thurman RG. Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF-kappaB, and TNF-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278:G652-661
- 24 Kono H, Rusyn I, Bradford BU, Connor HD, Mason RP, Thurman RG. Allopurinol prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:296-303
- 25 Okada K, Marubayashi S, Fukuma K, Yamada K, Dohi K. Effect of the 21-aminosteroid on nuclear factor-kappa B activation of Kupffer cells in endotoxin shock. *Surgery* 2000;127:79-86
- 26 Itabashi K, Ito Y, Takahashi T, Ishii K, Sato K, Kakita A. Protective effects of urinary trypsin inhibitor (UTI) on hepatic microvasculature in hypotensive brain-dead rats. *Eur Surg Res* 2002;34:330-338
- 27 Aosasa S, Ono S, Mochizuki H, Tsujimoto H, Ueno C, Matsumoto A. Mechanism of the inhibitory effect of protease inhibitor on tumor necrosis factor alpha production of monocytes. *Shock* 2001;15:101-105

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

基因表达谱芯片技术筛选 NS5ATP11 反式调节基因

王琳, 成军

王琳, 成军, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技公关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 北京市中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

王琳, 成军. 基因表达谱芯片技术筛选 NS5ATP11 反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2749-2752
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2749.asp>

摘要

目的: 应用基因芯片技术研究未知功能基因 NS5ATP11 的表达对于肝细胞基因表达谱的影响。

方法: 从 HepG2 细胞 RNA 中用反转录聚合酶链反应法(RT-PCR)扩增出 NS5ATP11 编码区 DNA, 常规分子生物学技术构建 NS5ATP11 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP11, 利用脂质体转染技术转染 HepG2 细胞, NS5ATP11 的表达以 Western blot 杂交技术证实. 从转染和非转染细胞 HepG2 中提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 并进行基因芯片技术分析。

结果: 证实构建 pcDNA3.1(-)-NS5ATP11 在 HepG2 细胞中表达正确. NS5ATP11 重组表达载体和空白载体转染的 HepG2 细胞的基因表达改变进行分析. 结果表明, 8 种基因的表达水平上调, 10 种基因的表达水平下调。

结论: NS5ATP11 对于肝细胞基因表达谱存在一定影响; 基因芯片技术是分析蛋白反式调节基因表达谱的重要技术途径, 有助于了解 NS5ATP11 对肝细胞和其他生物学功能的调节作用。

0 引言

在嗜肝病毒中丙型肝炎病毒(HCV)被认为是有引起人类肝脏疾病的主要因素, 感染全世界约 2% 的人口^[1-2]. HCV 编码的非结构蛋白 5A 是一种具有隐性反式激活作用的磷蛋白, 参与调节细胞周期、干扰素耐受、脂质和糖类的代谢以及其他细胞内信号转导, 但其对细胞进程影响的生物学机制所知很少^[3-7]. 我们分别应用酵母双杂交^[8]、抑制性消减杂交^[9]、基因芯片^[3]和 SV40 早期启动子/增强子功能分析^[10]等技术从不同角度对 NS5A 的功能进行研究得到的结果说明, NS5A 功能复杂多样. 应用基因芯片技术对 NS5A 转染的肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的基因表达谱变化进行比较研究, 我们发现了 NS5A 上调表达的未知功能基因, 命名为 NS5ATP11, 并对之进行了克隆^[11]. 我们对 NS5ATP11 转染肝癌细胞系的基因表达谱进行分析, 获得了部分上调或下调表达及未知功能基因。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态 *E.coli* JM109 (本室保存), pcDNA3.1(-) 真核表达载体 (Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂 (Gibco), mRNA Purification 试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR

Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega). 真核表达载体及细胞转染 HBV HBxAg 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5ATP11 为本室构建^[25]. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP11 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2 方法 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 NS5ATP11 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析. 参照 Schena *et al* 的方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5 μ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在 5 \times SSC+2 g/L SDS 20 μ L 杂交液中. 包含 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因、抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000–3 000 bp. 靶基因以 0.5 g/L 溶解于 3 \times SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线(UV)交联, 再分别用 2 g/L SDS、水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液

处理 10 min, 晾干备用. 将基因芯片和杂交探针在 95 $^{\circ}$ C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 $^{\circ}$ C 杂交 15–17 h. 依次以 2 \times SSC+2 g/L SDS、1 g/L \times SSC+2 g/L SDS、1 g/L \times SSC 洗涤 10 min, 室温晾干. 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImageGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3 >2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 <0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱^[12–19].

2 结果

真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5ATP11 由本室构建. 总 RNA 的吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ >1.89, 热稳定实验 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 与 -20 $^{\circ}$ C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, mRNA 主要集中于 0.9–4.0 kb 的连续条带.

2.1 NS5ATP11 上调基因 (表 1).

2.2 NS5ATP11 下调基因 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为该基因的下调基因. 结果有 10 种基因的表达水平下调 (表 2).

表 1 表达显著增加的基因

GenBank 登陆号	编码蛋白	Cy5/Cy3
NM_014863	B cell RAG associated protein (GALNAC4S-6ST), mRNA B 细胞重组激活蛋白结合蛋白	3.000
NM_003463	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1), mRNA 蛋白酪氨酸磷酸酶	3.042
NM_002736	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta (PRKAR2B), mRNA cAMP 依赖的蛋白激酶	3.175
NM_005627	serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK), mRNA 血清/糖皮质激素调节激酶	3.358
NM_004827	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (ABCG2), mRNA ATP 结合盒亚家族 G	3.453
NM_007268	Ig superfamily protein (Z39IG), mRNA Ig 超家族蛋白	3.564
D50683	mRNA for TGF- β type I receptor alpha, complete cds 转化生长因子 β 2R α	3.939
NM_006096	N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1), mRNA N-myc 下游调节基因 1	6.376

表 2 表达显著下降的基因

GenBank 登陆号	编码蛋白	Cy5/Cy3
NM_012248	selenophosphate synthetase 2 (SEPHS2), mRNA 磷酸硒合成酶 2	0.161
NM_002388	minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae) (MCM3), mRNA 小染色体维持缺陷 3(酿酒酵母)	0.168
NM_002292	laminin, beta 2 (laminin S) (LAMB2), mRNA 层粘连蛋白 B2	0.171
NM_001034	ribonucleotide reductase M2 polypeptide (RRM2), mRNA 核糖核苷酸还原酶 M2 多肽	0.174
NM_004184	tryptophanyl-tRNA synthetase (WARS), mRNA 色氨酸-tRNA 合成酶	0.189
NM_001033	Homo sapiens tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor) (TIMP1) 金属蛋白酶的抑制因子	0.223
NM_003254	TRAF and TNF receptor associated protein (TTRAP), mRNA TRAF、TNF 受体结合蛋白	0.236
NM_016614	Homo sapiens mRNA for KIAA0968 protein, partial cds KIAA0968 蛋白	0.245
AB023185	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1 (EIF4A1), mRNA 真核翻译起始因子 4A	0.255
BC006997	Ras-GTPase-activating protein(GAP) SH3-domain-binding protein(G3BP), mRNA Ras-GTP 酶激活蛋白结合蛋白	0.256

3 讨论

NS5A 是丙型肝炎病毒重要的调节蛋白, 作用于病毒自身及宿主细胞多种功能性蛋白, 调节并改变他们的活性, 为病毒复制与传播提供有利环境和免疫逃避策略. 一些体内外实验证实 NS5A 可以直接作用或反式调节宿主蛋白及基因表达, 本实验室曾对 NS5A 基因表达谱变化进行比较, 发现了上调表达的未知功能基因 NS5ATP11 并将其克隆, 片段全长 1 257 bp, 基因产物由 418 个氨基酸残基(aa)组成. 为了进一步探讨该未知基因的功能, 本实验再次应用基因芯片技术, 对于转染和未转染该基因的 HepG2 细胞进行了分析, 以期发现其部分下游信息和对 HCV NS5A 致病机制的影响.

获得的表达显著增加的 8 类基因包括: B 细胞重组激活蛋白结合蛋白、蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP4A1)、cAMP 依赖的蛋白激酶、血清 / 糖皮质激素调节激酶、ATP 结合盒亚家族 G、Ig 超家族蛋白、转化生长因子 $\beta 2R\alpha$ 及 N-myc 下游调节基因 1(NDRG1). 其中 NDRG1 基因的上调十分显著, Cy5/Cy3 > 6. 是 N-myc 下游调节基因家族成员, 这个在多种细胞内高度保守的蛋白被 p53 和 DNA 损伤刺激所诱导, 而在细胞生长的条件下表达被抑制, 说明其参与细胞内应激应答机制. 在 N-myc 敲除的小鼠胚胎及分化早期的组织中, N-myc 活性与 NDRG1 表达呈负相关, 在肿瘤细胞中被分化刺激剂诱导. 研究还发现 NDRG1 是代谢抑制基因, 说明在细胞分化中可能起作用. 另外报道 NDRG1 蛋白在细胞内具有穿梭在细胞质及细胞核之间的运动行为, 其磷酸化形式依赖于细胞外刺激剂, 有可能 NDRG1 在细胞中起到信号的传递作用^[13-18]. NS5ATP11 对该基因的上调作用可能与 NS5A 改变细胞周期的生物学功能有关. PTP4A1 编码的蛋白是一种蛋白酪氨酸磷酸酯酶, 对大鼠的研究显示, 该基因可能是细胞丝裂源刺激的立早基因^[19]. SGK 编码一个丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 调节细胞的分解代谢信号转导, 刺激肝糖分解和蛋白质水解, 并抑制蛋白和葡萄糖的合成, 参与糖尿病并发病的病理生理反应^[20-21]. ABCG2 编码的膜结合蛋白属于 ATP 结合盒(ABC)运输蛋白超家族, 在正常组织中介导细胞内毒性物质的排泄, 防止毒素的堆积, 因此该蛋白也与多种药物耐药相关, 研究发现其在对化疗制剂的抵抗中发挥作用^[22-23]. NS5ATP11 对上述基因的上调作用可推测该蛋白在细胞代谢和膜运输中的功能.

表达显著降低的基因包括: 磷酸硒合成酶 2、小染色体维持缺陷 3、层粘连蛋白 B2、核糖核苷酸还原酶 M2 多肽、色氨酸-tRNA 合成酶、金属蛋白酶的抑制因子、TRAF、TNF 受体结合蛋白、真核翻译起始因子 4A、Ras-GTP 酶激活蛋白结合蛋白以及一个未知功能蛋白. TTRAP 编码二价阳离子依赖的磷酸二酯酶, 结合 CD40、肿瘤坏死因子受体 75 和 TNF 结合因子, 并抑制核因子 kappa-B 活性, 参与 DNA 修复和转录因子的激活^[24]. G3BP 为 Ras-GTP 酶激活蛋白 SH3-域结合蛋

白, 物理上与 GAP 的 SH3 域结合, 对于 Ras 的信号转导是必要的. Ras 激活时, GAP-G3BP 复合体发生组建, 其氨基末端的两个核糖核蛋白基序具有 RNA 结合蛋白的特征而参与 RNA 代谢进程^[25-28]. 被 NS5ATP11 下调的另一蛋白是金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP1). TIMP 是参与细胞外基质降解代谢的基质金属蛋白酶(MMP)特异性抑制物, 可以抑制所有 MMP 的活性, 在肝纤维化的发生发展中起重要作用^[29-30]. NS5ATP11 对他的下调可能将对有序的肝再生和抗纤维化产生抑制作用.

总之, NS5ATP11 是机体中正常存在的基因, 对其他基因的调节体现了其潜在的生物学功能, 通常情况下只引起细胞正常的生理活动, 但当其表达受到病毒蛋白 NS5A 上调后, 相关的某些生物信号将被放大或削减, 平衡被打破, 引起一系列病理改变. 我们注意到 NDRG1 可通过 NS5ATP11 介导被 NS5A 显著上调, 对于细胞分化和信号转导具有意义, 但在 HCV 的致病机制中所承担的角色还不清楚, 尚需进一步的证实.

4 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16:A185
- 3 Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol* 1998;72:6199-6206
- 4 Park KJ, Choi SH, Lee SY, Hwang SB, Lai MM. Nonstructural 5A protein of hepatitis C virus modulates tumor necrosis factor alpha-stimulated nuclear factor kappa B activation. *J Biol Chem* 2002;277:13122-13128
- 5 He Y, Nakao H, Tan SL, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S, Jacobs BL, Katze MG. Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* 2002;76:9207-9217
- 6 Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- 7 Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002;21:4801
- 8 王琳, 李克, 成军. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2003;28:54-56
- 9 刘妍, 陆荫英, 成军. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- 10 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:939-942
- 11 王琳, 李克, 成军, 张健, 梁耀东, 刘妍. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 11 的克隆化研究. 胃肠病和肝病杂志 2003;12:257-259
- 12 Kurdistan SK, Arizti P, Reimer CL, Sugrue MM, Aaronson SA, Lee SW. Inhibition of tumor cell growth by RTP/rit42 and its responsiveness to p53 and DNA damage. *Cancer Res* 1998;58:4439-4444
- 13 Shimono A, Okuda T, Kondoh H. N-myc-dependent repression of ndr1, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. *Mech Dev* 1999;83:39-52

- 14 Wakisaka Y, Furuta A, Masuda K, Morikawa W, Kuwano M, Iwaki T. Cellular distribution of NDRG1 protein in the rat kidney and brain during normal postnatal development. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1515-1525
- 15 van Belzen N, Dinjens WN, Diesveld MP, Groen NA, van der Made AC, Nozawa Y, Vlietstra R, Trapman J, Bosman FT. A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms. *Lab Invest* 1997;77:85-92
- 16 Xu B, Lin L, Rote NS. Identification of a stress-induced protein during human trophoblast differentiation by differential display analysis. *Biol Reprod* 1999;61:681-686
- 17 Piquemal D, Joulia D, Balaguer P, Basset A, Marti J, Commes T. Differential expression of the RTP/Drg1/Ndr1 gene product in proliferating and growth arrested cells. *Biochim Biophys Acta* 1999;1450:364-373
- 18 Agarwala KL, Kokame K, Kato H, Miyata T. Phosphorylation of RTP, an ER stress-responsive cytoplasmic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:641-647
- 19 Carter DA. Expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase gene. *Biochim Biophys Acta* 1998;1442:405-408
- 20 Maiyar AC, Leong ML, Firestone GL. Importin- α mediates the regulated nuclear targeting of serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by recognition of a nuclear localization signal in the kinase central domain. *Mol Biol Cell* 2003;14:1221-1239
- 21 Firestone GL, Giampaolo JR, O'Keefe BA. Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell Physiol Biochem* 2003;13:1-12
- 22 Abbott BL. ABCG2 (BCRP) expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hematol Oncol* 2003;21:115-130
- 23 Zhao R, Goldman ID. Resistance to antifolates. *Oncogene* 2003;22:7431-7457
- 24 Pye S, Declercq W, Ibrahim A, Michiels C, Van Rietschoten JG, Dewulf N, de Boer M, Vandenabeele P, Huylebroeck D, Remacle JE. TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor- κ B activation. *J Biol Chem* 2000;275:18586-18593
- 25 French J, Stirling R, Walsh M, Kennedy HD. The expression of Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding proteins, G3BPs, in human breast cancers. *Histochem J* 2002;34:223-231
- 26 Barnes CJ, Li F, Mandal M, Yang Z, Sahin AA, Kumar R. Heregulin induces expression, ATPase activity, and nuclear localization of G3BP, a Ras signaling component, in human breast tumors. *Cancer Res* 2002;62:1251-1255
- 27 Liu Y, Zheng J, Fang W, You J, Wang J, Cui X, Wu B. Identification of metastasis associated gene G3BP by differential display in human cancer cell sublines with different metastatic potentials G3BP as highly expressed in non-metastatic. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:35-38
- 28 Kennedy D, French J, Guitard E, Ru K, Tocque B, Mattick J. Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies. *J Cell Biochem* 2001;84:173-187
- 29 Peng ZM, Yang ZL, Liu YW. Expression of MMP1 and TIMP1 proteins in lung cancer and its biological significance. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 2002;27:159-161
- 30 Wang A, Yang X, Wang W, Zuo F, Wang Q, He F. Effect of recombinant human augmentor of liver regeneration on gene expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rat with experimental liver fibrosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:610-612

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

基因表达谱芯片技术筛选 HCTP4 反式调节基因

刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 王燕颖

刘敏, 成军, 王琳, 邵清, 张健, 王燕颖, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 北京市中国人民解放军302医院传染病研究所基因治疗研究中心, c.j@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-07-30 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究丙型肝炎病毒核心(HCV core)蛋白的反式调节基因HCTP4作用的靶基因。

方法: 构建HCTP4基因的真核表达载体pcDNA3.1(-)-

HCTP4, 应用基因表达谱芯片技术对pcDNA3.1(-)-HCTP4转染的HepG2(人肝母细胞瘤细胞系)细胞和转染空载体的相同细胞差异表达的mRNA进行检测和分析。

结果: HepG2细胞经转染HCTP4后, 有104条差异基因表达, 其中54条基因表达增强, 50条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞的增生、分化及细胞的信号转导密切相关。

结论: HCTP4是一种病毒反式激活蛋白, 对于肝细胞基因表达谱有显著影响, 与细胞的增生、分化及细胞的信号转导密切相关, 在HCV的致病过程中有重要作用。

刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 王燕颖. 基因表达谱芯片技术筛选 HCTP4 反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2752-2756
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2752.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)可引起慢性肝炎、肝硬化及肝细胞癌(HCC),目前有1.7亿人感染,中国普通人群抗-HCV的阳性率约为3.2%,干扰素联合利巴韦林是其治疗方案,但是疗效不佳,其核心问题之一是有关发病机制不清。HCV core蛋白长191 aa,是一种多功能蛋白质,除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外,还具有调节细胞凋亡、脂代谢、转录、免疫呈递等作用,特别是在细胞凋亡中的作用可能与丙肝慢性化及肝细胞癌(HCC)的发生密切。HCV core蛋白具有广泛的反式激活作用,这种反式激活的作用机制,一方面是HCV core蛋白本身可以与感染的靶细胞的基因组中相关启动子序列结合,影响基因表达。另外一种机制就是HCV core蛋白与感染靶细胞核中转录因子蛋白进行结合,从而对于靶细胞基因的表达产生间接的影响。

肝炎病毒蛋白与宿主蛋白相互作用,可能是病毒感染导致肝细胞损伤和肝细胞癌发生、发展的重要原因。为了从不同的角度对HCV core的反式调节基因进行验证及研究,我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)和分子克隆方法对HCV core反式调节的靶基因HCTP4成功地进行了筛选和克隆^[1]。为更加广泛深入地研究HCV core的反式调节基因HCTP4,我们应用基因表达谱芯片技术对HCTP4反式调节的靶基因进行筛选鉴定研究,试图对HCTP4的生物学功能有所了解,探索丙肝慢性化及肝细胞癌发生的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞及感受态大肠杆菌JM109(本室保存),pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6通用引物及pGEM-Teasy载体(Promega)。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 HCTP4蛋白真核表达质粒pcDNA3.1(-)-HCTP4为本室构建并保存。用Lipofectamine PLUS 转染试剂将2 μg pcDNA3.1(-)-HCTP4及pcDNA3.1(-)空载体分别转染35 mm平皿HepG2细胞,48 h后收获细胞。

1.2.2 细胞mRNA提取 使用mRNA Purification试剂盒,直接提取转染了HCTP4表达质粒及空载体的HepG2细胞mRNA,经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析。

1.2.3 探针标记 常规方法逆转录标记cDNA探针并纯化。Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μg), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μg)。乙醇沉淀后溶解在20 μL 5 × SSC+2 g/L SDS杂交液中。

1.2.4 芯片制备 芯片包含的1 152个cDNA由上海联合基因有限公司提供,包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等。以通用引物进行PCR扩增,PCR产物长度为1 000–3 000 bp。靶基因以0.5 g/L溶解于3 × SSC溶液中,用Cartesian公司的Cartesian 7500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样。玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min),紫外线(UV)交联,再分别用0.2 g/L SDS、水及0.2 g/L的硼氢化钠溶液处理10 min,晾干备用。

1.2.5 预杂交 将预杂交液放入95 °C水浴锅内变性2 min,将待预杂交的芯片放入95 °C水浴锅内变性30 s,芯片取出后即放入无水乙醇中30 s,晾干。将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内,盖上盖玻片,放入杂交箱内42 °C预杂交5–6 h。

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于95 °C水浴中变性2 min;芯片置于95 °C水浴中变性30 s,芯片取出浸无水乙醇30 s,探针取出后迅速置于冰上。将探针置于芯片上,用盖玻片覆盖,置于杂交舱中,用Parafilm密封,放入42 °C杂交箱内杂交过夜(16–18 h)。依次以2 × SSC+2 g/L SDS、1 g/L × SSC+2 g/L SDS、1 g/L × SSC洗涤10 min,室温晾干。

1.2.7 扫描与分析 用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片。用预先选定的内参照基因(24条管家基因,每个基因点2个点,共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正。用ImaGene 3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度,计算Cy5/Cy3比值。阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0,红色荧光,显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5,为绿色荧光,显示表达减弱。

2 结果

2.1 HCTP4蛋白的表达载体构建 HCTP4蛋白真核表达质粒pcDNA3.1(-)-HCTP4由本室构建。

2.2 总RNA及mRNA的定性、定量分析 总RNA的吸光度A₂₆₀/A₂₈₀>1.89,热稳定实验70 °C保温1 h与-20 °C 1 h电泳条带比较,显示28 S条带无明显降解,电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA。mRNA主要集中于0.9–4.0 kb的连续条带。

2.3 HCTP4蛋白上调基因类型 在基因芯片的扫描分析中,如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在2.000以上,就判断为HCTP4蛋白的上调基因。我们在研究中发现有54种基因的表达水平上调(表1)。

表1 HCTP4蛋白部分上调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	2.000	苹果酸盐脱氢酶 1(MDH1)
2	2.011	磷酸二酯酶 2A(PDE2A)
3	2.014	转录变体 1(FAP48)
4	2.017	雌激素调节蛋白 LIV-1
5	2.017	DKFZp564L2416克隆

6	2.030	亲脂素亚家族 3 成员 A 2
7	2.033	4 跨膜位点亚家族 A1(MS4A1)
8	2.048	脑丙氨酸脱羧酶(GAD1)
9	2.055	核糖体蛋白 L34(RPL34)
10	2.058	锌指蛋白 217(ZNF217)
11	2.068	酯酶 D
12	2.079	博莱霉素水解酶(BLMH)
13	2.088	溶血磷脂酶(LYPLA1)
14	2.089	KIAA0035 基因
15	2.091	RPB5 介导蛋白(RMP)
16	2.096	cAMP 反应元素结合蛋白 CRE-BPa
17	2.118	Ran 结合蛋白 2
18	2.123	墨角藻糖基转移酶 8(FUT8)
19	2.126	转录抑制蛋白(UK114)
20	2.138	热休克蛋白 8(HSP8)
21	2.152	KIAA0205 基因产物(KIAA0205)
22	2.156	异质核糖核蛋白 K
23	2.174	γ -氨基丁酸 A 受体 γ 2(GABRG2)
24	2.174	三十碳六烯环氧化物酶(SQLE)
25	2.183	泛素连接酶 E2D3(UBE2D3)
26	2.211	T 细胞白血病毒易位变异基因(TCTA)
27	2.256	热休克蛋白(HSP105B)
28	2.281	凋亡蛋白 1 抑制因子(MIHC)
29	2.281	CGI107
30	2.285	酪蛋白激酶 1(CSNK1)
31	2.303	热休克蛋白(HSJ2)
32	2.325	细胞内氯化物通道 4(CLIC4)
33	2.344	KIAA0824 蛋白
34	2.370	细胞骨架相关的维生素 A 反应(JVVA)
35	2.378	KIAA 基因产物(KIAA0009)
36	2.395	T 细胞受体重排 β 链基因 V 区
37	2.396	核受体亚家族 3, C 组, 成员 1(NR3C1)
38	2.403	BCRA2 区的假想蛋白
39	2.411	假想蛋白 FLJ20432
40	2.414	cAMP 依赖性蛋白激酶 II(PRKA2B)
41	2.445	Ig 超家族蛋白(Z39IG)
42	2.460	B 细胞淋巴瘤 10(BCL10)
43	2.498	焦磷酸酶(无机的)(PP)
44	2.525	cAMP 分解依赖的蛋白激酶 β (PRKACB)
45	2.559	confilin 同工型 1
46	2.621	选择素 2(CUL2)
47	2.635	肠促胰酶肽型 A 受体基因
48	2.658	热休克蛋白 40
49	2.676	C5 固醇脱氢酶
50	2.690	假想蛋白 9535
51	2.694	转化生长因子- β
52	2.697	染色体分离因子 1 类(CSE1L)
53	2.730	假想蛋白 FLJ11806
54	2.802	肌小管素相关蛋白 6

2.4 HCTP4 蛋白下调基因 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为 HCTP4 蛋白的下调基因. 我们在研究中发现有 50 种基因的表达水平下调(表 2).

表 2 HCTP4 蛋白部分下调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	0.040	白细胞转录延长因子 2(EF2)
2	0.188	支架黏附因子 B(SAFB)
3	0.214	肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1(ABLIM)
4	0.234	KIAA0100 基因产物(KIAA0100)
5	0.259	MAP 激酶激活死亡域(MADD)
6	0.266	prosaposin(PSAP)
7	0.304	小染色体持续缺陷因子 3(MCM3)
8	0.313	DEAD/H 盒多肽 21(DDX21)
9	0.317	DNA, ATP 依赖性连接酶 III (LIG3)
10	0.338	碱化素(BSG)
11	0.343	多聚酶 II 多肽 E(POLR2E)
12	0.347	金属蛋白酶 1(MP1)
13	0.348	小 EDRK 富集因子 2(SERF2)
14	0.368	ras 同源基因家族成员 C(ARHC)
15	0.369	胰岛素受体(INSR)
16	0.373	硫氧化还原素还原酶(TXNRD1)
17	0.375	组织蛋白酶 E(CTSE)
18	0.390	丝分裂素激活蛋白激酶激酶 2(MAP3K2)
19	0.396	尤因瘤破坏点区 1(EWSR1)
20	0.397	RAD23A
21	0.404	N-myc 下游调节基因 2(NDRG2)
22	0.406	肿瘤坏死因子受体超家族成员 5(TNFRSF5)
23	0.414	蛋白磷酸酶 2 调节亚型 A
24	0.415	N-酰基-肽水解酶(APEH)
25	0.415	v-raf 鼠胸腺瘤 3 611 病毒癌基因类同子 1(ARAF1)
26	0.416	组织特有的移植抗原 P35B(TSTA3)
27	0.416	G 蛋白途径抑制子 1(GPS1)
28	0.420	1, 25-二羟基维生素 D-3(VDUP1)
29	0.420	肌肉丙酮酸激酶(PKM2)
30	0.426	类组织相容性 13
31	0.431	蛋白磷酸酶 1(PPP1)
32	0.444	CD47 抗原
33	0.450	v-akt 鼠胸腺瘤病毒基因类同子 1(AKT1)
34	0.453	妊娠特有 β 1 糖蛋白 6(PSG6)
35	0.454	干扰素调节因子 2(IRF2)
36	0.458	肌动蛋白
37	0.466	通过死亡域协助 TNFRSF1A(TrADD)
38	0.469	粒素(GRN)
39	0.471	TAL1 中断点(SIL)
40	0.471	果蝇属激酶(PLK)
41	0.475	转移生长因子 β 1(TGFB1)

42	0.478	精氨酸琥珀酸盐合成酶(ASS)
43	0.479	KIAA0943 蛋白
44	0.481	多核巨细胞克隆 15351
45	0.481	CGI-78 蛋白
46	0.490	丝氨酸蛋白激酶抑制子
47	0.493	谷胱甘肽过氧化物酶 3(GPX3)
48	0.495	转羟乙醛酶(TKT)
49	0.498	NY-REN-62 抗原
50	0.498	烯醇化酶 3

3 讨论

与宿主多种形式蛋白相互作用,可能是 HCV 感染导致肝细胞损伤和肝细胞癌发生、发展的重要原因. HCV core 蛋白转基因小鼠发生 HCC 病理学特征直接证明了 HCV core 蛋白的这种作用^[2-4]. 因此,研究 HCV core 蛋白结合蛋白对于 HCV 感染慢性化的机制,以及探讨 HCV 感染治疗新方法的研究,具有十分重要的意义. 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)和分子克隆方法对 HCV core 反式调节的靶基因 HCTP4 成功地进行筛选和克隆. HCTP4 作为获得新的编码基因序列,关于其生物学功能,甚至其医学意义的研究,有待进一步研究.

我们应用酵母双杂交系统-3 筛选出与 HCTP4 相互作用的蛋白基因 11 种,其中免疫球蛋白 λ 轻链、智能弹(mind bomb, MIB)、小核糖核蛋白 G、UMP-CMP 激酶与免疫调节、信号转导及能量供给等作用相关,说明 HCV core 的反式调节基因 HCTP4 具有相关作用,证明 HCTP4 与 core 蛋白在 HCV 感染致病机制作用密切相关^[5]. 应用 SSH 技术筛选到新基因 HCTP4 与诱导膜损伤的癌前受体、肿瘤排斥抗原(TRA)、肝细胞癌抗原、Fn、干扰素调节因子 2 结合蛋白、干扰素 γ 有相互作用,而这些基因与免疫及肿瘤发生有关,推测 HCTP4 在 Core 蛋白与这些基因之间起桥梁作用.

基因芯片技术是研究基因表达谱改变的有效分析技术^[6-8]. 实验中我们用基因芯片技术分析 HCTP4,结果表明,54 种基因的表达水平上调,50 种基因的表达水平下调. 在上调基因中,细胞内氯化物通道 4 介导纤维母细胞与肌成纤维细胞间的转化,与肝纤维化发生有关^[9]. 锌指蛋白 217 增高与肿瘤发生有关^[10]. 凋亡蛋白 1 抑制因子与细胞凋亡关系密切^[11]. 细胞骨架相关的维生素 A 反应调节细胞分化^[12]. cAMP 是一种重要的信号分子,对各种细胞功能有重要作用, cAMP 通过使不同靶蛋白磷酸化而转导信号,但 cAMP 发挥作用须通过激活 cAMP 依赖的蛋白激酶,所以 cAMP 依赖的蛋白激酶与信号转导及细胞功能关系密切^[13-14].

在下调基因中,转移生长因子 $\beta 1$ (TGFB1)与控制增生、分化有关,调节细胞生长的抑制作用,其信号传导途径发生障碍可引起肿瘤发生^[15]. 肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1(ABLIM)在调节进化方面有重要作用,是肿

瘤抑制基因之一^[16]. HCTP4 使 TGFB1 和 ABLIM 表达降低,与 HCV 感染肿瘤发生密切相关. 鞘脂脂激活因子蛋白由单基因 prosaposin 编码,在蛋白分解过程中编码四种不同的鞘脂激活因子蛋白, prosaposin(PSAP)或鞘脂激活因子蛋白缺乏时导致各种鞘脂脂储存疾病^[17-18]. 胰岛素是一种多效性激素,通过与胰岛素受体结合参与多种代谢和有丝分裂^[19]. HCTP4 使 PSAP 和胰岛素受体表达减低,与 HCV 引起糖、脂肪代谢异常有关^[20-21]. DNA, ATP 依赖性连接酶 III 与 DNA 修复、重组有关,在 DNA 损伤因子引起的细胞凋亡过程中由钙激活蛋白酶降解^[22]. 硫氧化还原素还原酶(TXNRD1)是一种氧化还原蛋白,参与细胞增生、转化、凋亡. CD47 抗原广泛分布在各种组织,在膜运输和信号转导中有重要作用^[23-24]. DEAD/H 盒多肽 21(DDX21)与细胞生长、分裂有关,在核糖体 RNA 的编辑、运输、转录过程中有重要作用^[25]. MAP 激酶激活死亡域(MADD)与细胞凋亡有关^[26]. N-myc 下游调节基因 2 属于 α/β 水解酶超家族,是一种胞质蛋白,与肿瘤发生有关^[27]. 肿瘤坏死因子受体超家族成员 5(TNFRSF5)介导多种免疫和炎症反应,包括 T 细胞依赖性免疫球蛋白的转换、记忆性 B 细胞发育和生发中心的形成^[28-29].

总之,我们的研究结果表明,与 HCTP4 相互作用的基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导、免疫调节、肿瘤发生等. 进一步证明了 HCTP4 确在 HCV 的发病过程中有重要作用. 其中 HCV 与多种基因如转移生长因子 $\beta 1$ 、肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1 等有相互作用为首次发现,这为 HCV 的致病机制提供了新线索,有待进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 刘敏, 成军, 王琳, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因 HCTP4 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:233-236
- 2 Liu M, Liu Y, Cheng J, Zhang SL, Wang L, Shao Q, Zhang J, Yang Q. Transactivating effect of hepatitis C virus core protein: A suppression subtractive hybridization study. *World J Gastroenterol* 2004;10:1746-1749
- 3 Van Pelt JF, Severi T, Crabbe T, Eetveldt AV, Verslype C, Roskams T, Fevery J. Expression of hepatitis C virus core protein impairs DNA repair in human hepatoma cells. *Cancer Lett* 2004;209:197-205
- 4 Watashi K, Shimotohno K. The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: A novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *Cancer Sci* 2003;94:937-943
- 5 刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东. 应用白细胞 cDNA 文库的酵母双杂交技术筛选 HCTP4 结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12:832-835
- 6 Dubois JW, Hill S, England LS, Edge T, Masson L, Trevors JT, Brousseau R. The development of a DNA microarray-based assay for the characterization of commercially formulated microbial products. *J Microbiol Methods* 2004;58:251-262
- 7 Sartippour MR, Heber D, Henning S, Elashoff D, Elashoff R, Rubio R, Zhang L, Norris A, Brooks MN. cDNA microarray analysis of endothelial cells in response to green tea reveals a suppressive phenotype. *Int J Oncol* 2004;25:193-202
- 8 Weeraratna AT, Nagel JE, de Mello-Coelho V, Taub DD. Gene expression profiling: from microarrays to medicine. *J Clin Immunol* 2004;24:213-224

- 9 Ronnov-Jessen L, Villadsen R, Edwards JC, Petersen OW. Differential expression of a chloride intracellular channel gene, CLIC4, in transforming growth factor-beta1-mediated conversion of fibroblasts to myofibroblasts. *Am J Pathol* 2002; 161:471-480
- 10 Nonet GH, Stampfer MR, Chin K, Gray JW, Collins CC, Yaswen P. The ZNF217 gene amplified in breast cancers promotes immortalization of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2001;61:1250-1254
- 11 Horrevoets AJ, Fontijn RD, van Zonneveld AJ, de Vries CJ, ten Cate JW, Pannekoek H. Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood* 1999;93:3418-3431
- 12 Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 2003;22:3307-3318
- 13 Cartier C, Hemonnot B, Gay B, Bardy M, Sanchiz C, Devaux C, Briant L. Active cAMP-dependent protein kinase incorporated within highly purified HIV-1 particles is required for viral infectivity and interacts with viral capsid protein. *J Biol Chem* 2003;278:35211-35219
- 14 Zidovetzki R, Wang JL, Chen P, Jeyaseelan R, Hofman F. Human immunodeficiency virus Tat protein induces interleukin 6 mRNA expression in human brain endothelial cells via protein kinase C- and cAMP-dependent protein kinase pathways. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:825-833
- 15 Fukuchi M, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Masuda N, Sohda M, Manda R, Tsukada K, Kato H, Kuwano H. Increased expression of c-Ski as a co-repressor in transforming growth factor-beta signaling correlates with progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004;108: 818-824
- 16 Kim AC, Peters LL, Knoll JH, Van Huffel C, Ciciotte SL, Kleyn PW, Chishti AH. Limatin (LIMAB1), an actin-binding LIM protein, maps to mouse chromosome 19 and human chromosome 10q25, a region frequently deleted in human cancers. *Genomics* 1997;46:291-293
- 17 Ahn VE, Faull KF, Whitelegge JP, Fluharty AL, Prive GG. Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:38-43
- 18 Sun Y, Qi X, Grabowski GA. Saposin C is required for normal resistance of acid beta-glucosidase to proteolytic degradation. *J Biol Chem* 2003;278:31918-31923
- 19 He HJ, Kole S, Kwon YK, Crow MT, Bernier M. Interaction of filamin A with the insulin receptor alters insulin-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2003;278:27096-27104
- 20 Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004;126:840-848
- 21 Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 126:529-540
- 22 Bordone L, Campbell C. DNA ligase III is degraded by calpain during cell death induced by DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 2002;277:26673-26680
- 23 Lechner S, Muller-Ladner U, Neumann E, Spottl T, Schlottmann K, Ruschoff J, Scholmerich J, Kullmann F. Thioredoxin reductase 1 expression in colon cancer: discrepancy between in vitro and in vivo findings. *Lab Invest* 2003;83:1321-1331
- 24 Anestis K, Arner ES. Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *J Biol Chem* 2003;278:15966-15972
- 25 Henning D, So RB, Jin R, Lau LF, Valdez BC. Silencing of RNA helicase II/Galpha inhibits mammalian ribosomal RNA production. *J Biol Chem* 2003;278:52307-52314
- 26 Lim KM, Chow VT. Induction of marked apoptosis in mammalian cancer cell lines by antisense DNA treatment to abolish expression of DENN (differentially expressed in normal and neoplastic cells). *Mol Carcinog* 2002;35:110-126
- 27 Deng Y, Yao L, Chau L, Ng SS, Peng Y, Liu X, Au WS, Wang J, Li F, Ji S, Han H, Nie X, Li Q, Kung HF, Leung SY, Lin MC. N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int J Cancer* 2003;106:342-347
- 28 Contin C, Pitard V, Itai T, Nagata S, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* 2003;278:32801-32809
- 29 Eeva J, Postila V, Matto M, Nuutinen U, Ropponen A, Eray M, Pelkonen J. Kinetics and signaling requirements of CD40-mediated protection from B cell receptor-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 2003;33:2783-2791

应用表达谱芯片技术研究 NS5ATP13 的反式调节基因

张黎颖, 邓红, 成军, 党晓燕, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 纪泛扑, 邵清

张黎颖, 邓红, 党晓燕, 纪泛扑, 西安交通大学第二医院感染科
陕西省西安市 710004

成军, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 邵清, 中国人民解放军第
302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重
点实验室 北京市 100039

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 北京市中国人民解
放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究 HCV 非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP13 的反式调节基因。

方法: 构建 NS5ATP13 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP13, 应用基因表达谱芯片技术对 pcDNA3.1(-)-NS5ATP13 转染的人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞和转染空载体的相同细胞的差异表达 mRNA 进行检测和分析。

结果: HepG2 细胞经转染 NS5ATP13 后, 有 86 条差异基因表达, 其中 46 条基因表达增强, 40 条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞的增生、分化及细胞的信号转导、代谢、凋亡密切相关。

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了 NS5ATP13 的反式调节基因, 为进一步阐明 NS5ATP13 的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

张黎颖, 邓红, 成军, 党晓燕, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 纪泛扑, 邵清.
应用表达谱芯片技术研究 NS5ATP13 的反式调节基因. 世界华人消化杂志
2004;12(11):2757-2761

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2757.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属, 是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒。在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌, 而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关^[1-10]。其基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基(aa)的多肽前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区。因为 HCV 的基因复制形式没有经过 DNA 阶段, 不存在 HCV 基因组与肝细胞基因组 DNA 的整合, 所以, HCV 主要是通过基因组编码蛋白和肝细胞蛋白之间的相互作用及肝细胞蛋白与 HCV 调节基因的相互作用造成对肝细胞的损伤。其多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白

NS5A 基因(位于 6 258-7 601 nt 之间)编码的 56 ku 的 NS5A 蛋白(448 aa)具有多种生物学功能, 在 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程中具有十分重要的作用^[11-14]。研究报道, NS5A 上存在干扰素 α 敏感决定区(ISDR), 与干扰素治疗的敏感性相关^[15-16]; 此外, NS5A 还是一种作用很强的基因转录激活因子^[17-21], 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染 HCV 的细胞发生恶性转化过程有关, 我室已证明他可以反式激活 SV40 早期启动子/增强子^[21], 并应用抑制性消减杂交技术(SSH)对 NS5A 的反式调节基因进行了初步的研究^[22]。NS5ATP13 是我室利用 SSH 从分别转染真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A 和 pcDNA3.1(-)空载体的 HepG2 细胞中筛选出来的, 经过 PCR 扩增, TA 克隆, 测序鉴定证实, 已在 GenBank 上注册成功, 注册号为 AY820769。NS5ATP13 基因的编码序列全长为 2 103 个核苷酸(nt), 编码产物由 700 aa 组成。本研究为了进一步阐明 HCV 的致病机制, 应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)^[23-24]。对于 HCV 的 NS5A TP13 反式调节的靶基因成功地进行筛选, 为今后更加广泛深入地研究 HCV NS5A 在 HCV 的致病机制中的作用及新基因 NS5ATP13 的生物学功能提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Gibco 公司, FuGENE 购自 Roche 公司, NS5ATP13 真核表达质粒由本室构建。表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和取材 在 35 mm 培养皿中常规培养 HepG2 细胞, 细胞生长至对数期时, 以脂质体转染试剂 FuGENE 分别将 2 μ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP13 和空载体 pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每 5×10^6 个细胞加入 1 mL Trizol 试剂, 立即于液氮中保存。

1.2.2 总RNA提取 使用 Trizol 试剂一步法提取 NS5ATP13 表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A TP13 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于 -20 $^{\circ}$ C 和 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化。

1.2.3 探针标记 参照 Chena *et al*^[25] 方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μ g),

Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在 20 μ L 5 \times SSC+2 g/L SDS 杂交液中.

1.2.4 芯片制备 芯片包含的 1 152 个 cDNA, 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因、抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000–3 000 bp. 靶基因以 0.5 g/L 溶解于 3 \times SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合 (2 h)、室温干燥 (30 min), 紫外线交联, 再分别用 2 g/L SDS、双蒸水及 2 g/L 硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.5 预杂交 将预杂交液放入 95 $^{\circ}$ C 水浴锅内变性 2 min, 将待预杂交的芯片放入 95 $^{\circ}$ C 水浴锅内变性 30 s, 芯片取出后即放入无水乙醇中 30 s, 晾干. 将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内, 盖上盖玻片, 放入杂交箱内 42 $^{\circ}$ C 预杂交 5–6 h.

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于 95 $^{\circ}$ C 水浴中变性 2 min; 芯片置于 95 $^{\circ}$ C 水浴中变性 30 s, 芯片取出浸于无水乙醇 30 s, 探针取出后迅速置于冰上. 将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱中, 用 Parafilm 密封, 放入 42 $^{\circ}$ C 杂交箱内杂交过夜 (16–18 h). 依次以 2 \times SSC+2 g/L SDS、1 : 1 000 SSC +2 g/L SDS、1 : 1 000 SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.7 扫描与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因 (24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点) 对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3 > 2.5, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.4, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 总 RNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A_{260}/A_{280} > 2.01, 热稳定实验 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 与 -20 $^{\circ}$ C 1 h 的电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交体系, 在芯片上设置了阴性对照 (8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素 (呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素 (呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 000 个基因中筛选出差异表达基因共 86 条, 占 8.6%, 其中 46 条基因表达增强, 40 条基因表达降低.

2.3 差异表达基因分析 部分表达增强的基因 (表 1). 部分表达降低的基因 (表 2).

表 1 部分表达显著增加的基因

编号	Cy5/ Cy3	编码蛋白
1	2.512	酪蛋白激酶 1a1 (CSNK1A1)
2	2.516	RNA 结合基序蛋白 6 (RBM6)
3	2.526	磷脂酶 B1 (LYPLA1)
4	2.568	细胞骨架相关蛋白
5	2.579	神经紧张肽 (NTS)
6	2.579	翻译抑制蛋白 p14.5 (UK114)
7	2.602	转化生长因子 β II 受体 α
8	2.612	氯离子通道 /p53 调节器官氯离子通道蛋白 4 (CLIC4)
9	2.618	RB 结合蛋白
10	2.618	低密度脂蛋白相关蛋白 2 (LRP2)
11	2.620	黑素瘤缺乏因子 2 (AIM2)
12	2.636	乳酸脱氢酶 B
13	2.656	泛素特异性蛋白酶 11 (USP1)
14	2.657	肿瘤高表达因子 (HEC) 富含亮氨酸重复序列
15	2.689	调节因子 X2, 影响人类组织相容性抗原 II 表达
16	2.708	cAMP 依赖性蛋白激酶催化亚单位 β (PRKACB)
17	2.770	选择素 2 (CUL2)
18	2.789	鲨烯环氧化酶 (SQLE), mRNA
19	2.793	Ran 结合蛋白 2 (RanBP2alpha)
20	2.821	凋亡蛋白 1 抑制因子 (MIHC)
21	2.870	DnaJ 类热休克蛋白 40 (HLJ1)
22	2.904	低电压依赖性钙离子通道 α 1 亚单位
23	2.918	alkB 分子类似物
24	2.954	转录因子 7 (TCF7)
25	2.965	甾醇 C5 脱氢酶 (SC5DL), mRNA
26	2.979	亚铁螯合酶
27	3.021	嗜乳脂蛋白亚家族 2 成员 A2 (BTN2A2)
28	3.087	钾离子电压门控通道 KQT 样亚家族成员 3
29	3.110	脆性 X 精神迟滞蛋白 1 (FMR1)
30	3.119	FYN 结合蛋白 (FYB-120/130)
31	3.323	包含 WD 重复序列的 SOCS 盒
32	3.457	细胞分裂周期蛋白 23 (CDC23)
33	3.755	造血细胞特异性 Lyn 底物 1 (HCLS1)
34	4.025	γ 氨基丁酸 α 受体 γ 2
35	4.053	FK506 结合相关蛋白 (FAP48) 转录子
36	5.609	cAMP- 依赖性蛋白激酶调节亚单位 II β (PRKAR2B)

表2 部分表达显著降低的基因

编号	Cy5/ Cy3	编码蛋白
1	0.243	核糖体蛋白 L32 (RPL32)
2	0.253	突触素样蛋白(SYPL), mRNA
3	0.274	基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP1)
5	0.280	层粘连蛋白 β 2 (LAMB2)
6	0.282	谷胱甘肽过氧化物酶 1 (GPX1)
7	0.282	BRCA2 和 CDKN1A 相互作用蛋白(BCCIP)转录本 C
8	0.316	转化生长因子 β 1 (TGFB1)
9	0.322	热休克蛋白 70(HSPA9B)
10	0.338	小 RNA 活化复合物, 多肽 1
11	0.352	微管相关蛋白, RP/EB 家族成员 2(MAPRE2)
12	0.354	CD79A 结合蛋白 1 (IGBP1),
13	0.355	乙酰辅酶 A 氧化酶 1 样蛋白
14	0.357	蛋白磷酸激酶 1 催化亚单位 α 型
15	0.359	核仁蛋白
16	0.364	蜡样质脂褐素
17	0.364	钙调素结合蛋白 1 (CALD1)
18	0.369	金属硫蛋白 3(MT3)
19	0.369	假想 IL-16 蛋白前体
20	0.370	肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合物亚单位 3 (ARPC3)
21	0.374	层粘连蛋白 B 受体
22	0.374	有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 2(MAP3K2)
23	0.377	环指蛋白和肿瘤坏死因子受体相关蛋白
24	0.383	肿瘤坏死因子受体相关蛋白 2 (TRAF2)
25	0.384	ADP 核糖基转移酶样 1 (ADPRTL1)
26	0.390	谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)
27	0.391	鸟苷酸环化酶 1 α 3 (GUCY1A3)
28	0.392	有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 3 (MAP4K3)
29	0.393	亮氨酸拉链
30	0.394	富含半胱氨酸血管生成诱导因子 (CYR61)
31	0.397	核糖体蛋白 S10
32	0.400	钙联接蛋白(CANX)

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)感染与肝纤维化及肝细胞癌(HCC)的发生密切相关, 其中病毒基因编码的非结构蛋白 NS5A 起着重要的作用. HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白的羧基末端, 是丝氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58. NS5A 是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征. 研究发现^[26]NS5A 蛋白通过双链 RNA-活化蛋白激酶结合域与病毒复制、干扰素抵抗、细胞生长的限制有一定关系, 但是对结合域在疾病发展过程中的作用的认识是很有限的, 有待于进一步研究. 具有易变性特质的 NS5A 在感染 HCV 的自然病程中维持稳定, 表明其可能在病毒的生活周期中扮演中心角色. 一般来说, 转录的反式

激活因子是在细胞核中起作用的, 而 NS5A 定位于细胞内质网, 因此推测 NS5A 可能参与了细胞信号传导途径. NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用^[27]. Ghosh *et al*^[28]研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21WAF1, 激活人肝癌细胞中增生细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. NS5A cDNA 能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 这一证据直接证明了 HCV NS5A 蛋白的恶性转化潜能.

NS5ATP13 是我室利用 SSH 从分别转染真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A 和 pcDNA3.1(-)空载体的 HepG2 细胞中筛选出来的 NS5A 上调的未知功能蛋白基因, 我们应用基因表达谱芯片技术筛选 NS5ATP13 反式调节基因, 发现 NS5ATP13 可显著影响 HepG2 细胞基因表达谱, 得到 86 条显著差异表达基因, 包括已知和未知功能基因, 分别与细胞生长、分化、凋亡等相关.

结果表明 NS5ATP13 可上调 Ran 结合蛋白 2(RanBP2)、凋亡蛋白 1 抑制因子(IAP-1, MIHC, cIAP2)、细胞分裂周期蛋白 23(CDC23)等. RanBP2 作为核孔复合物的组成成分, 在细胞核内外的物质转运中发挥着重要的作用, Forler *et al*^[29]敲除果蝇细胞中的 RanBP2, 发现细胞增生和 mRNA 向核外转运均受到抑制. Gordon *et al*^[30]研究发现 IAP-1 在恶性胸膜间皮瘤细胞中高表达. Lee *et al*^[31]研究发现 CDC23 通过聚集 Dfp1-Hsk1 激酶及刺激小染色体维持蛋白的磷酸化参与复制前体复合物的活化过程. NS5ATP13 可能通过上调这些凋亡相关因子抑制细胞凋亡, 从而引起肿瘤的发生. cAMP 依赖性蛋白激酶(PKA)可作用于多种与糖脂代谢有关的酶类、一些离子通道和某些转导因子, 使他们发生磷酸化而改变其活性状态. 垂体腺苷酸环化酶激活肽被 PKA 激活后, 可引起细胞膜的持续去极化, 发挥抗凋亡的效应, 其中, 钾离子通道的活化在程序性细胞死亡中扮演了重要的角色^[32]. NS5ATP13 通过上调 PKA 和钾离子电压门控通道 KQT 样亚家族成员 3, 也可能是抑制凋亡发生的机制之一. 同时, 渗透压应激、炎症细胞因子、脂多糖(LPS)、紫外线、生长因子等细胞应激可以激活 p38 MAPK 信号转导途径, 而有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 2(MAP3K2)通过 p38 MAPK 信号转导途径可激活胱冬肽酶-3, 诱导细胞凋亡^[33]. MAP3K 还可磷酸化 IKK (I κ B kinase). IKK 是一种丝/苏氨酸蛋白酶, 活化后可以磷酸化 I κ B, 进而释放出活化的 NF- κ B, 使其进入细胞核内发挥转录因子的功能^[34]. NS5ATP13 下调多种诱导细胞凋亡的信号分子, 可能在肝细胞癌的发生机制中起到一定的作用.

基质金属蛋白酶抑制剂 1(TIMPI)作为胶原酶抑制剂, 抑制 I 型, II 型, III 型胶原分解, 在肝纤维化的发生发展过程中起到重要作用^[35]. 转化生长因子 β 1

(TGF β 1)可诱导黏附分子CD44, CD49b, CD49, CD51, CD54和CD61以及细胞外基质成分纤维连接蛋白, 层粘连蛋白和IV型胶原的表达^[36]. NS5ATP13通过下调TIMP1、TGFB1、层粘连蛋白 β 2 (LAMP2)是否可以抑制肝纤维化的发生和发展, 其作为感染HCV的机体保护机制有待于进一步研究. NS5ATP13除了与已知蛋白基因相互作用外, 尚可作用于一些未知功能基因, 例如可下调假想蛋白AF038182, 其生物学功能以及该假想基因的结构和功能有待于进一步研究.

总之, 利用基因芯片高通量多角度系统地进行基因特征分析, 为我们从一个全新的视角认识靶基因NS5ATP13和HCV非结构蛋白NS5A的分子生物学功能、HCV的致病机制和肝纤维化及肝癌的发病机制打下了重要基础.

4 参考文献

- Zandman-Goddard G, Levy Y, Weiss P, Shoenfeld Y, Langevitz P. Transverse myelitis associated with chronic hepatitis C. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:111-113
- Moriguchi H, Kobayashi M, Chung RT, Sato C. Optimal IFN therapy for 40-year-old patients with severe HCV-1b infection. *Gastroenterology* 2003;124:1166-1167
- Chowdhury A, Santra A, Chaudhuri S, Dhali GK, Chaudhuri S, Maity SG, Naik TN, Bhattacharya SK, Mazumder DN. Hepatitis C virus infection in the general population: A community-based study in west bengal, India. *Hepatology* 2003;37:802-809
- Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. Racial differences in the relationship between hepatitis C infection and iron stores. *Hepatology* 2003;37:795-801
- Ryu KJ, Kim JH, Lee SW. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol Ther* 2003;7:386-395
- Kasuno K, Ono T, Matsumori A, Nogaki F, Kusano H, Watanabe H, Yodoi J, Muso E. Hepatitis C virus-associated tubulointerstitial injury. *Am J Kidney Dis* 2003;41:767-775
- Chen S, Wang Y. Genetic variation characteristics of the envelope region of hepatitis C virus in the patients with chronic hepatitis. *Zhonghua Shiyen He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002;16:219-222
- Hui CK, Belaye T, Montegrande K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-517
- Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Lepar G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion* 2003;43:541-544
- Sunagawa H, Takayama H, Yamashiro T, Sasaki H, Sashida Y, Matsuura K, Kayou M. Hepatocellular carcinoma in a patient with primary biliary cirrhosis and seronegativity for markers of hepatitis B virus and hepatitis C virus: report of a case. *Surg Today* 2003;33:219-223
- Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999;30:1004-1013
- Zech B, Kurtenbach A, Krieger N, Strand D, Blencke S, Morbitzer M, Salassidis K, Cotten M, Wissing J, Obert S, Bartenschlager R, Herget T, Daub H. Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Gen Virol* 2003;84:555-560
- Georgopoulou U, Caravokiri K, Mavromara P. Suppression of the ERK1/2 signaling pathway from HCV NS5A protein expressed by herpes simplex recombinant viruses. *Arch Virol* 2003;148:237-251
- Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and 53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 2002;76:11079-11090
- Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
- 成军. 慢性丙型肝炎病毒肝组织防御的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 刘妍, 段惠娟, 成军, 王建军, 陆荫英, 牟劲松, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活SV40病毒启动子的研究. 军医进修学院学报 2003;28:40-42
- 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- Jain KK. Current trends in molecular diagnostics. *Med Device Technol* 2002;13:14-18
- Ruano JM, Glidle A, Cleary A, Walmsley A, Aitchison JS, Cooper JM. Design and fabrication of a silica on silicon integrated optical biochip as a fluorescence microarray platform. *Biosens Bioelectron* 2003;18:175-184
- Chena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- Franco S, Gimenez-Barcons M, Puig-Basagoiti F, Furcic I, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Saiz JC. Characterization and evolution of NS5A quasispecies of hepatitis C virus genotype 1b in patients with different stages of liver disease. *J Med Virol* 2003;71:195-204
- Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- Forler D, Rabut G, Ciccarelli FD, Herold A, Kocher T, Niggeweg R, Bork P, Ellenberg J, Izaurralde E. RanBP2/Nup358 provides a major binding site for NXF1-p15 dimers at the nuclear pore complex and functions in nuclear mRNA export. *Mol Cell Biol* 2004;24:1155-1167
- Gordon GJ, Appasani K, Parcells JP, Mukhopadhyay NK, Jaklitsch MT, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R. Inhibitor of apoptosis protein-1 promotes tumor cell survival in mesothelioma. *Carcinogenesis* 2002;23:1017-1024
- Lee JK, Seo YS, Hurwitz J. The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2334-2339
- Mei YA, Vaudry D, Basille M, Castel H, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I_k in the anti-apoptotic action of PACAP. *Eur J Neurosci* 2004;19:1446-1458

- 33 Pearl-Yafe M, Halperin D, Scheuerman O, Fabian I. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67:539-546
- 34 Schmidt C, Peng B, Li Z, Sclabas GM, Fujioka S, Niu J, Schmidt-Supprian M, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2003;12:1287-1300
- 35 Hsu YC, Chiu YT, Lee CY, Lin YL, Huang YT. Increases in fibrosis-related gene transcripts in livers of dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2004;11:408-417
- 36 Schierano G, Bellone G, Manzella C, Preti G, Emanuelli G. In vitro effect of transforming growth factor-beta on adhesion molecule expression by human gingival fibroblasts cultured in the presence of a titanium abutment. *J Periodontol* 2001;72:1658-1665

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对 IGF- I、IGF- II 表达的影响

何必立, 吕 宾, 徐 毅, 苗 青, 范一宏

何必立, 浙江省台州医院消化科 浙江省临海市 317000
吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏, 浙江省中医院消化科 浙江省杭州市 310006
项目负责人: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市, 浙江省中医院消化科.
lvbin@medmail.com.cn
电话: 0571-87032028 传真: 0571-87077785
收稿日期: 2004-08-30 接受日期: 2004-09-25

摘要

目的:探讨温郁金对人胃癌细胞SGC-7901的抑制作用及其作用机制。

方法:采用超临界二氧化碳萃取法提取温郁金挥发油成分。以氟尿嘧啶(5-Fu)为阳性对照药物, 采用MTT法, 测定温郁金提取物对体外培养胃癌细胞SGC-7901增生的影响; 应用放射免疫测定法分析温郁金提取物对细胞培养液中IGF- I、IGF- II 浓度水平的影响。

结果:超临界二氧化碳萃取法提取温郁金获得温郁金提取物1和提取物2。温郁金提取物1、提取物2对胃癌细胞的生长有显著的抑制作用(均 $P < 0.01$), 且抑制率随药物浓度的升高而增高, 存在明显的量效关系。200 mg/L浓度的温郁金提取物1和提取物2对胃癌细胞生长的抑制率分别为64.44%、60.80%, 在这个浓度水平, 其抑制肿瘤细胞生长作用与阳性对照药物5-Fu效果相当。温郁金提取物1、提取物2能降低胃癌细胞培养液中IGF- I、IGF- II 的浓度水平(均 $P < 0.05$)。

结论:温郁金提取物对人胃癌细胞SGC-7901生长有抑制作用, 其抑癌作用的机制可能与抑制胃癌细胞分泌IGF- I、IGF- II 有关。

何必立, 吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏. 温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对IGF- I、IGF- II 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2761-2763
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2761.asp>

0 引言

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)同肿瘤的关系近年来受到了广泛的关注^[1]。温郁金具有行气破血、消积止痛等作用, 是抗肿瘤复方中常见的药物, 前期在其抗肿瘤作用方面已有报道^[2], 但有关其对胰岛素样生长因子的影响研究鲜见。我们研究温郁金提取物对体外培养的胃癌细胞株SGC-7901的抑制作用, 并从此对胰岛素样生长因子 I (IGF- I)、胰岛素样生长因子 II (IGF- II)分泌的影响来分析其作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 胃腺癌细胞(SGC-7901)株(购自中科院上海细胞所), RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司, 噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶为上海生物工程公司产品, 氟尿嘧啶(5-Fu)为上海旭东海普药业有限公司产品, IGF- I 放免试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司, IGF- II 放免试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所, 二甲基亚砜为浙江杭州双林化工试剂厂产品, 温郁金购自浙江省中医院中药房, HA121-50-01型超临界萃取装置为江苏南通华安超临界实业公司产品, CO₂ 细胞培养箱为美国 Thermo Forma 公司产品, ELX800 酶标仪为美国 Bio-Tek 公司生产, SN-682 放射免疫γ计数器由中科院上海原子核研究所日环仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SGC-7901 细胞常规培养于含 100 mL/L 灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置 37 °C、50 mL/L 的 CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养。

1.2.2 温郁金提取物的制备 采用超临界CO₂流体萃取技术提取温郁金有效成分。萃取温度 40 °C, 压力 3×10^7 Pa, 时间为 120 min/循环, CO₂ 流量为 50 kg/h, 分离 1 的反应条件为: 压力 1.25×10^7 Pa, 温度 50 °C; 分离 2 的反应条件为压力 5.5×10^6 Pa, 温度 40 °C。获温郁金提取物 1、温郁金提取物 2 后 4 °C 避光冷藏保存。药物在使用前新鲜配制, 先用适量 DMSO 溶解, 再以 RPMI-1640 培养液进行稀释, 使其浓度达到用药需求。

1.2.3 细胞增生抑制试验(MTT 还原法) 对数生长期细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养液调整细胞悬液浓度为 1.0×10^7 /L 接种细胞于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L, 置 37 °C、50 mL/L CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养; 24 h 后, 更换不含胎牛血清的 1640 培养液再培养 24 h, 使细胞同步化; 换上含浓度依次为 25、50、100、200 mg/L 温郁金提取物 1、提取物 2 的完全培养液, 阴性对照组为不含温郁金的培养液, 空白对照组不含细胞, 阳性对照组加入含浓度依次为 25、50、100、200 mg/L 的 5-Fu 的完全培养液, 每个药物浓度设 6 个复孔; 分别继续培养 48 h; 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μ L, 37 °C 孵育 4 h, 再加入 150 μ L DMSO, 上微量振荡器振荡 10 min, 立即用酶标仪测定 490 nm 波长吸光度值(A)。

抑制率(%) = [(阴性对照 A - 空白 A) - (实验 A - 空白 A)] / (阴性对照 A - 空白 A) \times 100%

1.2.4 条件培养液中 IGF- I、IGF- II 含量的测定 对数生长期细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养液调整细胞悬液浓度为 5.0×10^7 /L, 接种细胞于 24 孔培养板中, 每孔 1 000 μ L, 37 °C、50 mL/L CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养; 24 h 后, 更换不含胎牛血清的 1640 培养液再培养 24 h, 使细胞同步化; 换上含浓度依次为 25、50、100 mg/L 温郁金提取物 1、提取物 2 的完全培养基, 阴性对照组细胞更换为 1 000 μ L 完全培养基, 分别继续培养 48 h, 收集各处理组培养液。按照 IGF- I、IGF- II 放免试剂盒的说明步骤测定培养液中 IGF- I 和 IGF- II 浓度, 由自动 γ 计数器预先编制的程序(以 B-NSB/B0-NSB 计算标准及待测样品结合百分率, 半对数绘制标准曲线)直接给出有关参数、标准曲线和样品浓度。

统计学处理 结果以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 组间比较采用方差分析, 量效关系采用相关与回归分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 温郁金对SGC-7901细胞增值的影响 温郁金提取物 1、提取物 2 随剂量的增加, 其对胃癌细胞的抑制率也增加(图 1, 表 1), 有显著相关性(P 均 < 0.01)。200 mg/L 的温郁金提取物 1、提取物 2 和对照药物 5-Fu 对胃癌细胞株生长的抑制作用无显著差异($P > 0.05$), 其抑制作用相当。

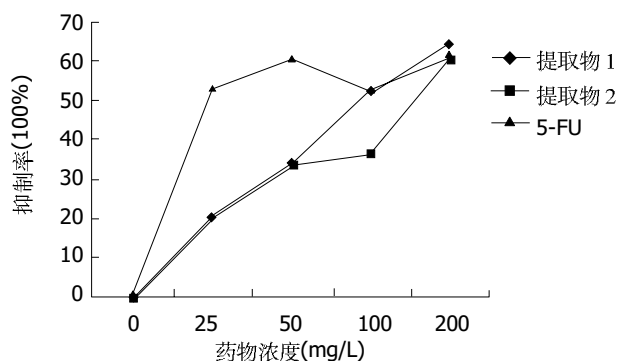


图 1 不同浓度药物对胃癌细胞生长的影响。

表 1 不同药物对胃癌细胞生长的影响

处理组	药物浓度(mg/L)	n	A 值	细胞抑制率(%)
提取物 1	200	6	0.2752 \pm 0.0242 ^b	64.44
提取物 1	100	6	0.3547 \pm 0.0332 ^b	51.59
提取物 1	50	6	0.4697 \pm 0.0270 ^b	33.00
提取物 1	25	6	0.5492 \pm 0.0278 ^b	20.15
提取物 2	200	6	0.2977 \pm 0.0075 ^d	60.80
提取物 2	100	6	0.4493 \pm 0.0291 ^d	36.29
提取物 2	50	6	0.4678 \pm 0.0111 ^d	33.30
提取物 2	25	6	0.5582 \pm 0.0330 ^d	18.70
5-Fu 对照组	200	6	0.2920 \pm 0.0146 ^f	61.72
5-Fu 对照组	100	6	0.3492 \pm 0.0210 ^f	52.48
5-Fu 对照组	50	6	0.2978 \pm 0.0270 ^f	60.78
5-Fu 对照组	25	6	0.3448 \pm 0.0274 ^f	53.18
阴性对照组	0	6	0.6738 \pm 0.0559	0

^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$, ^f $P < 0.01$ vs 阴性对照组。

2.2 温郁金对胃癌细胞培养液中 IGF- I、IGF- II 含量的影响 和对照组相比, 25、50、100 mg/L 浓度的温郁金提取物 1、提取物 2 对胃癌细胞培养液中 IGF- I 及 IGF- II 的含量均有较明显的下调作用 (P 均 < 0.01 , 表 2)。

表 2 温郁金对胃癌细胞培养液中 IGF- I、IGF- II 浓度的影响

处理组	药物浓度(mg/L)	n	IGF- I 含量(ug/L)	IGF- II 含量(ug/L)
对照组	0	4	28.2160 \pm 2.0554	0.1818 \pm 0.0504
提取物 1	25	4	13.5133 \pm 3.1200 ^b	0.1223 \pm 0.0219 ^e
提取物 1	50	4	10.5938 \pm 4.2190 ^b	0.1058 \pm 0.0067 ^f
提取物 1	100	4	7.6120 \pm 3.6616 ^b	0.0815 \pm 0.0211 ^f
提取物 2	25	4	20.0393 \pm 2.6845 ^c	0.1253 \pm 0.0192 ^b
提取物 2	50	4	15.6623 \pm 3.4037 ^d	0.1168 \pm 0.0122 ^b
提取物 2	100	4	12.7520 \pm 2.7613 ^d	0.0803 \pm 0.0095 ⁱ

^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$, ^g $P < 0.05$, ^h $P < 0.01$ vs 对照组。

3 讨论

超临界CO₂萃取技术是近20 a来在国际上取得迅速发展的化工分离技术, 在中药有效成分提取方面有诸多优

势^[3]. 我们运用超临界 CO₂ 萃取技术, 从温郁金中提取出其药用成分, 根据提取条件不同, 获得提取物 1、提取物 2, 所设定萃取条件大致相当于以乙醇和乙醚萃取所得, 提取物 1 主要含姜黄素, 而提取物 2 主要为挥发油成分. MTT 结果显示, 和阴性对照组比较, 浓度范围为 25–200 mg/L 的温郁金提取物 1、提取物 2 对 SGC-7901 均有显著的抑制作用 (P 均 < 0.05), 且有明显的量效关系.

以往温郁金中抗肿瘤成分研究较多的有两大类成分, 即姜黄素和挥发油. 研究者从直接细胞毒作用, 诱导细胞凋亡, 诱导肿瘤细胞分化等多个角度进行了其抗肿瘤作用机制的探讨^[2,4], 但针对细胞生长因子的研究少见.

胰岛素样生长因子系统 (IGFs) 由胰岛素样生长因子 I (IGF-I)、胰岛素样生长因子 II (IGF-II)、他们相应的受体 IGF-IR、IGF-IIR 及其 6 种胰岛素样生长因子相关蛋白 (IGFBPs) 组成. IGF-I 对各种细胞活动既有即刻作用又有远期影响, 而这些作用的发挥依赖于其和 IGF-IR 的结合. IGF-I 通过刺激细胞糖原和蛋白合成以及增强细胞摄取氨基酸和葡萄糖的能力而直接促进细胞蛋白质和碳水化合物代谢^[5]. IGF-I 也对细胞增生、分化、凋亡有间接的影响. 对很多细胞系而言, IGF-I 是强有力的有丝分裂促进剂, 他可通过增加 DNA 合成、上调细胞周期蛋白 D1 表达, 从而加速细胞从 G1 期向 S 期过渡^[6-7]. 另外, IGF-I 又通过上调 Bcl 蛋白表达, 下调 Bax 蛋白表达而提高 Bcl/Bax 二聚体含量, 这一变化可封闭细胞凋亡程序的启动^[8-9]. 同样, IGF-II 也具有促有丝分裂、抗细胞凋亡、促进细胞增生和分化作用.

鉴于 IGFs 在细胞增生、分化、凋亡、突变等过程中起着重要的作用, 最近数十年人们对 IGFs 在肿瘤细胞生长和发展中的作用进行了大量的研究, 结果表明: IGFs 与多种肿瘤包括白血病细胞、肉瘤、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、肠癌、肝癌、胰腺癌、肾癌等各种肿瘤的发生发展关系密切^[10-11]. IGFs 和胃癌的关系最初在体外细胞实验中被观察到, Thompson *et al*^[12] 在 1990 年报道在人胃癌细胞系 LIM-1839 中存在 IGF-II 的自分泌. Chung and Antoniades^[13] 于 1992 年用原位杂交法在 3 个人胃癌标本中检测到 IGF-I mRNA 的表达.

IGFs 和 IGF-IR 的结合激活酪氨酸激酶的活性, 从而促发一系列分子介导的信号转导级联反应. 目前已经清楚的信号转导途径有两个, 其一途径为激活 Ras 蛋白、Raf 蛋白和有丝分裂活化的蛋白激酶. 另一途径为激活三磷酸腺苷激酶而发挥作用^[5]. 除和 IGFs 结合而调节细胞有丝分裂和凋亡过程外, IGF-IR 还和细胞转化相关. 体外实验表明从细胞膜表明除去 IGF-IR 基因后, 可抑制细胞的转化^[14]. IGF-IIR 可通过和 IGF-II 结合而降低 IGF-II 的生物学活性.

鉴于 IGF 在肿瘤发生发展中的作用意义, 有学者采用阻断 IGF 的方法对肿瘤进行治疗, 方法有两种: 第

一, 阻断 IGF 的合成或分泌; 第二, 阻断 IGF 与受体的结合, 应用这些方法, 已取得了初步的效果^[15].

为了探讨温郁金提取物是否抑制胃癌细胞分泌 IGF, 我们采用放射免疫测定法检测不同浓度温郁金提取物 1、提取物 2 对胃癌细胞培养液中 IGF-I、IGF-II 含量的影响. 结果提示, 25、50、100 mg/L 温郁金两种提取物对胃癌细胞培养液中 IGF-I、IGF-II 含量均有显著的下调 (P 均 < 0.05), 提示温郁金可能通过影响胃癌细胞 IGF 的分泌起到抗肿瘤作用的.

温郁金对肿瘤细胞的调控机制复杂, 我们的研究仅提示温郁金提取物对体外培养的 SGC-7901 具有抑制其增生作用; 抑制胃癌细胞分泌 IGF-I 和 IGF-II 可能是其作用机制的一方面, 温郁金对胃癌细胞 IGF-I 和 IGF-II 基因表达及其受体的影响有待于进一步深入研究.

另外, 我们的研究中提取物化学成分不明确, 有待于进一步分离纯化, 但温郁金资源丰富, 在胃癌的化学防治中值得深入研究.

4 参考文献

- 1 Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000;21:215-244
- 2 王琰, 王慕邹. 姜黄属常用中药的研究进展. *中国药学杂志* 2001; 36:80-84
- 3 毛中兴, 赖炳森. 超临界二氧化碳技术在中药有效成分萃取中的应用. *北京中医* 2001;1:34-35
- 4 李国栋, 许付, 沈爱军. 莪术油的研究进展. *中国药学杂志* 2002; 37:806-809
- 5 Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34
- 6 Furlanetto RW, Harwell SE, Frick KK. Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells *in vitro*. *Mol Endocrinol* 1994;8:510-517
- 7 Dufourny B, Alblas J, van Teeffelen HA, van Schaik FM, van der Burg B, Steenbergh PH, Sussenbach JS. Mitogenic signaling of insulin-like growth factor I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:31163-31171
- 8 Parrizas M, LeRoith D. Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 1997;138:1355-1358
- 9 Wang L, Ma W, Markovich R, Lee WL, Wang PH. Insulin-like growth factor I modulates induction of apoptotic signaling in H9C2 cardiac muscle cells. *Endocrinology* 1998;139:1354-1360
- 10 LeRoith D, Baserga R, Helman L, Roberts CT Jr. Insulin-like growth factors and cancer. *Ann Intern Med* 1995;122:54-59
- 11 Macaulay VM. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 1992;65:311-320
- 12 Thompson MA, Cox AJ, Whitehead RH, Jonas HA. Autocrine regulation of human tumor cell proliferation by insulin-like growth factor-II: an *in vitro* model. *Endocrinology* 1990;126:3033-3042
- 13 Chung CK, Antoniades HN. Expression of c-sis platelet derived growth factor-B, insulin-like growth factor-I and transforming growth factor messenger RNA and their respective receptor messenger RNA in primary human gastric carcinomas: *in vivo* studies with *in situ* hybridization and Immunocytochemistry. *Cancer Res* 1992;52:3453-3459
- 14 Oates AJ, Schumaker LM, Jenkins SB, Pearce AA, DaCosta SA, Arun B, Ellis MJ. The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47:269-281
- 15 Huynh HT, Tetenes E, Wallace L, Pollak M. *In vivo* inhibition of insulin-like growth factor 1 gene expression by amoxifen. *Cancer Res* 1993;53:1727-1730

- 14 Wakisaka Y, Furuta A, Masuda K, Morikawa W, Kuwano M, Iwaki T. Cellular distribution of NDRG1 protein in the rat kidney and brain during normal postnatal development. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1515-1525
- 15 van Belzen N, Dinjens WN, Diesveld MP, Groen NA, van der Made AC, Nozawa Y, Vlietstra R, Trapman J, Bosman FT. A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms. *Lab Invest* 1997;77:85-92
- 16 Xu B, Lin L, Rote NS. Identification of a stress-induced protein during human trophoblast differentiation by differential display analysis. *Biol Reprod* 1999;61:681-686
- 17 Piquemal D, Joulia D, Balaguer P, Basset A, Marti J, Commes T. Differential expression of the RTP/Drg1/Ndr1 gene product in proliferating and growth arrested cells. *Biochim Biophys Acta* 1999;1450:364-373
- 18 Agarwala KL, Kokame K, Kato H, Miyata T. Phosphorylation of RTP, an ER stress-responsive cytoplasmic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:641-647
- 19 Carter DA. Expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase gene. *Biochim Biophys Acta* 1998;1442:405-408
- 20 Maiyar AC, Leong ML, Firestone GL. Importin- α mediates the regulated nuclear targeting of serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by recognition of a nuclear localization signal in the kinase central domain. *Mol Biol Cell* 2003;14:1221-1239
- 21 Firestone GL, Giampaolo JR, O'Keefe BA. Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell Physiol Biochem* 2003;13:1-12
- 22 Abbott BL. ABCG2 (BCRP) expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hematol Oncol* 2003;21:115-130
- 23 Zhao R, Goldman ID. Resistance to antifolates. *Oncogene* 2003;22:7431-7457
- 24 Pye S, Declercq W, Ibrahim A, Michiels C, Van Rietschoten JG, Dewulf N, de Boer M, Vandenabeele P, Huylebroeck D, Remacle JE. TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor- κ B activation. *J Biol Chem* 2000;275:18586-18593
- 25 French J, Stirling R, Walsh M, Kennedy HD. The expression of Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding proteins, G3BPs, in human breast cancers. *Histochem J* 2002;34:223-231
- 26 Barnes CJ, Li F, Mandal M, Yang Z, Sahin AA, Kumar R. Heregulin induces expression, ATPase activity, and nuclear localization of G3BP, a Ras signaling component, in human breast tumors. *Cancer Res* 2002;62:1251-1255
- 27 Liu Y, Zheng J, Fang W, You J, Wang J, Cui X, Wu B. Identification of metastasis associated gene G3BP by differential display in human cancer cell sublines with different metastatic potentials G3BP as highly expressed in non-metastatic. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:35-38
- 28 Kennedy D, French J, Guitard E, Ru K, Tocque B, Mattick J. Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies. *J Cell Biochem* 2001;84:173-187
- 29 Peng ZM, Yang ZL, Liu YW. Expression of MMP1 and TIMP1 proteins in lung cancer and its biological significance. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 2002;27:159-161
- 30 Wang A, Yang X, Wang W, Zuo F, Wang Q, He F. Effect of recombinant human augmentor of liver regeneration on gene expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rat with experimental liver fibrosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:610-612

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

基因表达谱芯片技术筛选 HCTP4 反式调节基因

刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 王燕颖

刘敏, 成军, 王琳, 邵清, 张健, 王燕颖, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 北京市中国人民解放军302医院传染病研究所基因治疗研究中心, c.j@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-07-30 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究丙型肝炎病毒核心(HCV core)蛋白的反式调节基因HCTP4作用的靶基因。

方法: 构建HCTP4基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-

HCTP4, 应用基因表达谱芯片技术对 pcDNA3.1(-)-HCTP4转染的HepG2(人肝母细胞瘤细胞系)细胞和转染空载体的相同细胞差异表达的mRNA进行检测和分析。

结果: HepG2细胞经转染HCTP4后, 有104条差异基因表达, 其中54条基因表达增强, 50条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞的增生、分化及细胞的信号转导密切相关。

结论: HCTP4是一种病毒反式激活蛋白, 对于肝细胞基因表达谱有显著影响, 与细胞的增生、分化及细胞的信号转导密切相关, 在HCV的致病过程中有重要作用。

刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 王燕颖. 基因表达谱芯片技术筛选 HCTP4 反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2752-2756
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2752.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)可引起慢性肝炎、肝硬化及肝细胞癌(HCC),目前有1.7亿人感染,中国普通人群抗-HCV的阳性率约为3.2%,干扰素联合利巴韦林是其治疗方案,但是疗效不佳,其核心问题之一是有关发病机制不清. HCV core蛋白长191 aa,是一种多功能蛋白质,除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外,还具有调节细胞凋亡、脂代谢、转录、免疫呈递等作用,特别是在细胞凋亡中的作用可能与丙肝慢性化及肝细胞癌(HCC)的发生密切. HCV core蛋白具有广泛的反式激活作用,这种反式激活的作用机制,一方面是HCV core蛋白本身可以与感染的靶细胞的基因组中相关启动子序列结合,影响基因表达. 另外一种机制就是HCV core蛋白与感染靶细胞核中转录因子蛋白进行结合,从而对于靶细胞基因的表达产生间接的影响.

肝炎病毒蛋白与宿主蛋白相互作用,可能是病毒感染导致肝细胞损伤和肝细胞癌发生、发展的重要原因.为了从不同的角度对HCV core的反式调节基因进行验证及研究,我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)和分子克隆方法对HCV core反式调节的靶基因HCTP4成功地进行了筛选和克隆^[1].为更加广泛深入地研究HCV core的反式调节基因HCTP4,我们应用基因表达谱芯片技术对HCTP4反式调节的靶基因进行筛选鉴定研究,试图对HCTP4的生物学功能有所了解,探索丙肝慢性化及肝细胞癌发生的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞及感受态大肠杆菌JM109(本室保存),pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6通用引物及pGEM-Teasy载体(Promega).

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 HCTP4蛋白真核表达质粒pcDNA3.1(-)-HCTP4为本室构建并保存.用Lipofectamine PLUS 转染试剂将2 μg pcDNA3.1(-)-HCTP4及pcDNA3.1(-)空载体分别转染35 mm平皿HepG2细胞,48 h后收获细胞.

1.2.2 细胞mRNA提取 使用mRNA Purification试剂盒,直接提取转染了HCTP4表达质粒及空载体的HepG2细胞mRNA,经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2.3 探针标记 常规方法逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μg), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解在20 μL 5 × SSC+2 g/L SDS杂交液中.

1.2.4 芯片制备 芯片包含的1 152个cDNA由上海联合基因有限公司提供,包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等.以通用引物进行PCR扩增,PCR产物长度为1 000–3 000 bp.靶基因以0.5 g/L溶解于3 × SSC溶液中,用Cartesian公司的Cartesian 7500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样.玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min),紫外线(UV)交联,再分别用0.2 g/L SDS、水及0.2 g/L的硼氢化钠溶液处理10 min,晾干备用.

1.2.5 预杂交 将预杂交液放入95 °C水浴锅内变性2 min,将待预杂交的芯片放入95 °C水浴锅内变性30 s,芯片取出后即放入无水乙醇中30 s,晾干.将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内,盖上盖玻片,放入杂交箱内42 °C预杂交5–6 h.

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于95 °C水浴中变性2 min;芯片置于95 °C水浴中变性30 s,芯片取出浸无水乙醇30 s,探针取出后迅速置于冰上.将探针置于芯片上,用盖玻片覆盖,置于杂交舱中,用Parafilm密封,放入42 °C杂交箱内杂交过夜(16–18 h).依次以2 × SSC+2 g/L SDS、1 g/L × SSC+2 g/L SDS、1 g/L × SSC洗涤10 min,室温晾干.

1.2.7 扫描与分析 用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片.用预先选定的内参照基因(24条管家基因,每个基因点2个点,共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正.用ImaGene 3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度,计算Cy5/Cy3比值.阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0,红色荧光,显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5,为绿色荧光,显示表达减弱.

2 结果

2.1 HCTP4蛋白的表达载体构建 HCTP4蛋白真核表达质粒pcDNA3.1(-)-HCTP4由本室构建.

2.2 总RNA及mRNA的定性、定量分析 总RNA的吸光度A₂₆₀/A₂₈₀>1.89,热稳定实验70 °C保温1 h与-20 °C 1 h电泳条带比较,显示28 S条带无明显降解,电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA. mRNA主要集中于0.9–4.0 kb的连续条带.

2.3 HCTP4蛋白上调基因类型 在基因芯片的扫描分析中,如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在2.000以上,就判断为HCTP4蛋白的上调基因.我们在研究中发现有54种基因的表达水平上调(表1).

表1 HCTP4蛋白部分上调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	2.000	苹果酸盐脱氢酶 1(MDH1)
2	2.011	磷酸二酯酶 2A(PDE2A)
3	2.014	转录变体 1(FAP48)
4	2.017	雌激素调节蛋白 LIV-1
5	2.017	DKFZp564L2416克隆

6	2.030	亲脂素亚家族 3 成员 A 2
7	2.033	4 跨膜位点亚家族 A1(MS4A1)
8	2.048	脑丙氨酸脱羧酶(GAD1)
9	2.055	核糖体蛋白 L34(RPL34)
10	2.058	锌指蛋白 217(ZNF217)
11	2.068	酯酶 D
12	2.079	博莱霉素水解酶(BLMH)
13	2.088	溶血磷脂酶(LYPLA1)
14	2.089	KIAA0035 基因
15	2.091	RPB5 介导蛋白(RMP)
16	2.096	cAMP 反应元素结合蛋白 CRE-BPa
17	2.118	Ran 结合蛋白 2
18	2.123	墨角藻糖基转移酶 8(FUT8)
19	2.126	转录抑制蛋白(UK114)
20	2.138	热休克蛋白 8(HSP8)
21	2.152	KIAA0205 基因产物(KIAA0205)
22	2.156	异质核糖核蛋白 K
23	2.174	γ -氨基丁酸 A 受体 γ 2(GABRG2)
24	2.174	三十碳六烯环氧化物酶(SQLE)
25	2.183	泛素连接酶 E2D3(UBE2D3)
26	2.211	T 细胞白血易位变异基因(TCTA)
27	2.256	热休克蛋白(HSP105B)
28	2.281	凋亡蛋白 1 抑制因子(MIHC)
29	2.281	CGI107
30	2.285	酪蛋白激酶 1(CSNK1)
31	2.303	热休克蛋白(HSJ2)
32	2.325	细胞内氯化物通道 4(CLIC4)
33	2.344	KIAA0824 蛋白
34	2.370	细胞骨架相关的维生素 A 反应(JVVA)
35	2.378	KIAA 基因产物(KIAA0009)
36	2.395	T 细胞受体重排 β 链基因 V 区
37	2.396	核受体亚家族 3, C 组, 成员 1(NR3C1)
38	2.403	BCRA2 区的假想蛋白
39	2.411	假想蛋白 FLJ20432
40	2.414	cAMP 依赖性蛋白激酶 II(PRKA2B)
41	2.445	Ig 超家族蛋白(Z39IG)
42	2.460	B 细胞淋巴瘤 10(BCL10)
43	2.498	焦磷酸酶(无机的)(PP)
44	2.525	cAMP 分解依赖的蛋白激酶 β (PRKACB)
45	2.559	confilin 同工型 1
46	2.621	选择素 2(CUL2)
47	2.635	肠促胰酶肽型 A 受体基因
48	2.658	热休克蛋白 40
49	2.676	C5 固醇脱氢酶
50	2.690	假想蛋白 9535
51	2.694	转化生长因子- β
52	2.697	染色体分离因子 1 类(CSE1L)
53	2.730	假想蛋白 FLJ11806
54	2.802	肌小管素相关蛋白 6

2.4 HCTP4 蛋白下调基因 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为 HCTP4 蛋白的下调基因. 我们在研究中发现有 50 种基因的表达水平下调(表 2).

表 2 HCTP4 蛋白部分下调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	0.040	白细胞转录延长因子 2(EF2)
2	0.188	支架黏附因子 B(SAFB)
3	0.214	肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1(ABLIM)
4	0.234	KIAA0100 基因产物(KIAA0100)
5	0.259	MAP 激酶激活死亡域(MADD)
6	0.266	prosaposin(PSAP)
7	0.304	小染色体持续缺陷因子 3(MCM3)
8	0.313	DEAD/H 盒多肽 21(DDX21)
9	0.317	DNA, ATP 依赖性连接酶 III (LIG3)
10	0.338	碱化素(BSG)
11	0.343	多聚酶 II 多肽 E(POLR2E)
12	0.347	金属蛋白酶 1(MP1)
13	0.348	小 EDRK 富集因子 2(SERF2)
14	0.368	ras 同源基因家族成员 C(ARHC)
15	0.369	胰岛素受体(INSR)
16	0.373	硫氧化还原素还原酶(TXNRD1)
17	0.375	组织蛋白酶 E(CTSE)
18	0.390	丝分裂素激活蛋白激酶激酶 2(MAP3K2)
19	0.396	尤因瘤破坏点区 1(EWSR1)
20	0.397	RAD23A
21	0.404	N-myc 下游调节基因 2(NDRG2)
22	0.406	肿瘤坏死因子受体超家族成员 5(TNFRSF5)
23	0.414	蛋白磷酸酶 2 调节亚型 A
24	0.415	N-酰基-肽水解酶(APEH)
25	0.415	v-raf 鼠胸腺瘤 3 611 病毒癌基因类同子 1(ARAF1)
26	0.416	组织特有的移植抗原 P35B(TSTA3)
27	0.416	G 蛋白途径抑制子 1(GPS1)
28	0.420	1, 25-二羟基维生素 D-3(VDUP1)
29	0.420	肌肉丙酮酸激酶(PKM2)
30	0.426	类组织相容性 13
31	0.431	蛋白磷酸酶 1(PPP1)
32	0.444	CD47 抗原
33	0.450	v-akt 鼠胸腺瘤病毒基因类同子 1(AKT1)
34	0.453	妊娠特有 β 1 糖蛋白 6(PSG6)
35	0.454	干扰素调节因子 2(IRF2)
36	0.458	肌动蛋白
37	0.466	通过死亡域协助 TNFRSF1A(TrADD)
38	0.469	粒素(GRN)
39	0.471	TAL1 中断点(SIL)
40	0.471	果蝇属激酶(PLK)
41	0.475	转移生长因子 β 1(TGFB1)

42	0.478	精氨酸琥珀酸盐合成酶(ASS)
43	0.479	KIAA0943 蛋白
44	0.481	多核巨细胞克隆 15351
45	0.481	CGI-78 蛋白
46	0.490	丝氨酸蛋白激酶抑制子
47	0.493	谷胱甘肽过氧化物酶 3(GPX3)
48	0.495	转羟乙醛酶(TKT)
49	0.498	NY-REN-62 抗原
50	0.498	烯醇化酶 3

3 讨论

与宿主多种形式蛋白相互作用,可能是 HCV 感染导致肝细胞损伤和肝细胞癌发生、发展的重要原因. HCV core 蛋白转基因小鼠发生 HCC 病理学特征直接证明了 HCV core 蛋白的这种作用^[2-4]. 因此,研究 HCV core 蛋白结合蛋白对于 HCV 感染慢性化的机制,以及探讨 HCV 感染治疗新方法的研究,具有十分重要的意义. 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)和分子克隆方法对 HCV core 反式调节的靶基因 HCTP4 成功地进行筛选和克隆. HCTP4 作为获得新的编码基因序列,关于其生物学功能,甚至其医学意义的研究,有待进一步研究.

我们应用酵母双杂交系统-3 筛选出与 HCTP4 相互作用的蛋白基因 11 种,其中免疫球蛋白 λ 轻链、智能弹(mind bomb, MIB)、小核糖核蛋白 G、UMP-CMP 激酶与免疫调节、信号转导及能量供给等作用相关,说明 HCV core 的反式调节基因 HCTP4 具有相关作用,证明 HCTP4 与 core 蛋白在 HCV 感染致病机制作用密切相关^[5]. 应用 SSH 技术筛选到新基因 HCTP4 与诱导膜损伤的癌前受体、肿瘤排斥抗原(TRA)、肝细胞癌抗原、Fn、干扰素调节因子 2 结合蛋白、干扰素 γ 有相互作用,而这些基因与免疫及肿瘤发生有关,推测 HCTP4 在 Core 蛋白与这些基因之间起桥梁作用.

基因芯片技术是研究基因表达谱改变的有效分析技术^[6-8]. 实验中我们用基因芯片技术分析 HCTP4,结果表明,54 种基因的表达水平上调,50 种基因的表达水平下调. 在上调基因中,细胞内氯化物通道 4 介导纤维母细胞与肌成纤维细胞间的转化,与肝纤维化发生有关^[9]. 锌指蛋白 217 增高与肿瘤发生有关^[10]. 凋亡蛋白 1 抑制因子与细胞凋亡关系密切^[11]. 细胞骨架相关的维生素 A 反应调节细胞分化^[12]. cAMP 是一种重要的信号分子,对各种细胞功能有重要作用, cAMP 通过使不同靶蛋白磷酸化而转导信号,但 cAMP 发挥作用须通过激活 cAMP 依赖的蛋白激酶,所以 cAMP 依赖的蛋白激酶与信号转导及细胞功能关系密切^[13-14].

在下调基因中,转移生长因子 $\beta 1$ (TGFB1)与控制增生、分化有关,调节细胞生长的抑制作用,其信号传导途径发生障碍可引起肿瘤发生^[15]. 肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1(ABLIM)在调节进化方面有重要作用,是肿

瘤抑制基因之一^[16]. HCTP4 使 TGFB1 和 ABLIM 表达降低,与 HCV 感染肿瘤发生密切相关. 鞘脂脂激活因子蛋白由单基因 prosaposin 编码,在蛋白分解过程中编码四种不同的鞘脂激活因子蛋白, prosaposin(PSAP)或鞘脂激活因子蛋白缺乏时导致各种鞘脂脂储存疾病^[17-18]. 胰岛素是一种多效性激素,通过与胰岛素受体结合参与多种代谢和有丝分裂^[19]. HCTP4 使 PSAP 和胰岛素受体表达减低,与 HCV 引起糖、脂肪代谢异常有关^[20-21]. DNA, ATP 依赖性连接酶 III 与 DNA 修复、重组有关,在 DNA 损伤因子引起的细胞凋亡过程中由钙激活蛋白酶降解^[22]. 硫氧化还原素还原酶(TXNRD1)是一种氧化还原蛋白,参与细胞增生、转化、凋亡. CD47 抗原广泛分布在各种组织,在膜运输和信号转导中有重要作用^[23-24]. DEAD/H 盒多肽 21(DDX21)与细胞生长、分裂有关,在核糖体 RNA 的编辑、运输、转录过程中有重要作用^[25]. MAP 激酶激活死亡域(MADD)与细胞凋亡有关^[26]. N-myc 下游调节基因 2 属于 α/β 水解酶超家族,是一种胞质蛋白,与肿瘤发生有关^[27]. 肿瘤坏死因子受体超家族成员 5(TNFRSF5)介导多种免疫和炎症反应,包括 T 细胞依赖性免疫球蛋白的转换、记忆性 B 细胞发育和生发中心的形成^[28-29].

总之,我们的研究结果表明,与 HCTP4 相互作用的基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导、免疫调节、肿瘤发生等. 进一步证明了 HCTP4 确在 HCV 的发病过程中有重要作用. 其中 HCV 与多种基因如转移生长因子 $\beta 1$ 、肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1 等有相互作用为首次发现,这为 HCV 的致病机制提供了新线索,有待进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 刘敏, 成军, 王琳, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因 HCTP4 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:233-236
- 2 Liu M, Liu Y, Cheng J, Zhang SL, Wang L, Shao Q, Zhang J, Yang Q. Transactivating effect of hepatitis C virus core protein: A suppression subtractive hybridization study. *World J Gastroenterol* 2004;10:1746-1749
- 3 Van Pelt JF, Severi T, Crabbe T, Eetveldt AV, Verslype C, Roskams T, Fevery J. Expression of hepatitis C virus core protein impairs DNA repair in human hepatoma cells. *Cancer Lett* 2004;209:197-205
- 4 Watashi K, Shimotohno K. The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: A novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *Cancer Sci* 2003;94:937-943
- 5 刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东. 应用白细胞 cDNA 文库的酵母双杂交技术筛选 HCTP4 结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12:832-835
- 6 Dubois JW, Hill S, England LS, Edge T, Masson L, Trevors JT, Brousseau R. The development of a DNA microarray-based assay for the characterization of commercially formulated microbial products. *J Microbiol Methods* 2004;58:251-262
- 7 Sartippour MR, Heber D, Henning S, Elashoff D, Elashoff R, Rubio R, Zhang L, Norris A, Brooks MN. cDNA microarray analysis of endothelial cells in response to green tea reveals a suppressive phenotype. *Int J Oncol* 2004;25:193-202
- 8 Weeraratna AT, Nagel JE, de Mello-Coelho V, Taub DD. Gene expression profiling: from microarrays to medicine. *J Clin Immunol* 2004;24:213-224

- 9 Ronnov-Jessen L, Villadsen R, Edwards JC, Petersen OW. Differential expression of a chloride intracellular channel gene, CLIC4, in transforming growth factor-beta1-mediated conversion of fibroblasts to myofibroblasts. *Am J Pathol* 2002; 161:471-480
- 10 Nonet GH, Stampfer MR, Chin K, Gray JW, Collins CC, Yaswen P. The ZNF217 gene amplified in breast cancers promotes immortalization of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2001;61:1250-1254
- 11 Horrevoets AJ, Fontijn RD, van Zonneveld AJ, de Vries CJ, ten Cate JW, Pannekoek H. Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood* 1999;93:3418-3431
- 12 Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 2003;22:3307-3318
- 13 Cartier C, Hemonnot B, Gay B, Bardy M, Sanchiz C, Devaux C, Briant L. Active cAMP-dependent protein kinase incorporated within highly purified HIV-1 particles is required for viral infectivity and interacts with viral capsid protein. *J Biol Chem* 2003;278:35211-35219
- 14 Zidovetzki R, Wang JL, Chen P, Jeyaseelan R, Hofman F. Human immunodeficiency virus Tat protein induces interleukin 6 mRNA expression in human brain endothelial cells via protein kinase C- and cAMP-dependent protein kinase pathways. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:825-833
- 15 Fukuchi M, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Masuda N, Sohda M, Manda R, Tsukada K, Kato H, Kuwano H. Increased expression of c-Ski as a co-repressor in transforming growth factor-beta signaling correlates with progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004;108: 818-824
- 16 Kim AC, Peters LL, Knoll JH, Van Huffel C, Ciciotte SL, Kleyn PW, Chishti AH. Limatin (LIMAB1), an actin-binding LIM protein, maps to mouse chromosome 19 and human chromosome 10q25, a region frequently deleted in human cancers. *Genomics* 1997;46:291-293
- 17 Ahn VE, Faull KF, Whitelegge JP, Fluharty AL, Prive GG. Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:38-43
- 18 Sun Y, Qi X, Grabowski GA. Saposin C is required for normal resistance of acid beta-glucosidase to proteolytic degradation. *J Biol Chem* 2003;278:31918-31923
- 19 He HJ, Kole S, Kwon YK, Crow MT, Bernier M. Interaction of filamin A with the insulin receptor alters insulin-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2003;278:27096-27104
- 20 Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004;126:840-848
- 21 Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 126:529-540
- 22 Bordone L, Campbell C. DNA ligase III is degraded by calpain during cell death induced by DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 2002;277:26673-26680
- 23 Lechner S, Muller-Ladner U, Neumann E, Spottl T, Schlottmann K, Ruschoff J, Scholmerich J, Kullmann F. Thioredoxin reductase 1 expression in colon cancer: discrepancy between in vitro and in vivo findings. *Lab Invest* 2003;83:1321-1331
- 24 Anestis K, Arner ES. Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *J Biol Chem* 2003;278:15966-15972
- 25 Henning D, So RB, Jin R, Lau LF, Valdez BC. Silencing of RNA helicase II/Galpha inhibits mammalian ribosomal RNA production. *J Biol Chem* 2003;278:52307-52314
- 26 Lim KM, Chow VT. Induction of marked apoptosis in mammalian cancer cell lines by antisense DNA treatment to abolish expression of DENN (differentially expressed in normal and neoplastic cells). *Mol Carcinog* 2002;35:110-126
- 27 Deng Y, Yao L, Chau L, Ng SS, Peng Y, Liu X, Au WS, Wang J, Li F, Ji S, Han H, Nie X, Li Q, Kung HF, Leung SY, Lin MC. N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int J Cancer* 2003;106:342-347
- 28 Contin C, Pitard V, Itai T, Nagata S, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* 2003;278:32801-32809
- 29 Eeva J, Postila V, Matto M, Nuutinen U, Ropponen A, Eray M, Pelkonen J. Kinetics and signaling requirements of CD40-mediated protection from B cell receptor-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 2003;33:2783-2791

应用表达谱芯片技术研究 NS5ATP13 的反式调节基因

张黎颖, 邓红, 成军, 党晓燕, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 纪泛扑, 邵清

张黎颖, 邓红, 党晓燕, 纪泛扑, 西安交通大学第二医院感染科
陕西省西安市 710004
成军, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 邵清, 中国人民解放军第
302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重
点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 北京市中国人民解
放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心 cj@genetherapy.com.cn
电话 010-66933392 传真 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究 HCV 非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP13 的反式调节基因。

方法: 构建 NS5ATP13 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP13, 应用基因表达谱芯片技术对 pcDNA3.1(-)-NS5ATP13 转染的人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞和转染空载体的相同细胞的差异表达 mRNA 进行检测和分析。

结果: HepG2 细胞经转染 NS5ATP13 后, 有 86 条差异基因表达, 其中 46 条基因表达增强, 40 条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞的增生、分化及细胞的信号转导、代谢、凋亡密切相关。

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了 NS5ATP13 的反式调节基因, 为进一步阐明 NS5ATP13 的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

张黎颖, 邓红, 成军, 党晓燕, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 纪泛扑, 邵清.
应用表达谱芯片技术研究 NS5ATP13 的反式调节基因. 世界华人消化杂志
2004, 12(11) 2757-2761
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2757.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属, 是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒。在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌, 而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关^[1-10]。其基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基(aa)的多肽前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区。因为 HCV 的基因复制形式没有经过 DNA 阶段, 不存在 HCV 基因组与肝细胞基因组 DNA 的整合, 所以, HCV 主要是通过基因组编码蛋白和肝细胞蛋白之间的相互作用及肝细胞蛋白与 HCV 调节基因的相互作用造成对肝细胞的损伤。其多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白

NS5A 基因(位于 6 258-7 601 nt 之间)编码的 56 ku 的 NS5A 蛋白(448 aa)具有多种生物学功能, 在 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程中具有十分重要的作用^[11-14]。研究报道, NS5A 上存在干扰素 α 敏感决定区(ISDR), 与干扰素治疗的敏感性相关^[15-16]。此外, NS5A 还是一种作用很强的基因转录激活因子^[17-21], 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染 HCV 的细胞发生恶性转化过程有关, 我室已证明他可以反式激活 SV40 早期启动子 / 增强子^[21], 并应用抑制性消杂交技术 (SSH)对 NS5A 的反式调节基因进行了初步的研究^[22]。NS5ATP13 是我室利用 SSH 从分别转染真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A 和 pcDNA3.1(-)空载体的 HepG2 细胞中筛选出来的, 经过 PCR 扩增, TA 克隆, 测序鉴定证实, 已在 GenBank 上注册成功, 注册号为 AY820769。NS5ATP13 基因的编码序列全长为 2 103 个核苷酸(nt), 编码产物由 700 aa 组成。本研究为了进一步阐明 HCV 的致病机制, 应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)^[23-24]。对于 HCV 的 NS5A TP13 反式调节的靶基因成功地进行了筛选, 为今后更加广泛深入地研究 HCVNS5A 在 HCV 的致病机制中的作用及新基因 NS5ATP13 的生物学功能提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Gibco 公司, FuGENE 购自 Roche 公司, NS5ATP13 真核表达质粒由本室构建。表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和取材 在 35 mm 培养皿中常规培养 HepG2 细胞, 细胞生长至对数期时, 以脂质体转染试剂 FuGENE 分别将 2 μ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP13 和空载体 pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每 5 \times 10⁶ 个细胞加入 1 mL Trizol 试剂, 立即于液氮中保存。

1.2.2 总 RNA 提取 使用 Trizol 试剂一步法提取 NS5ATP13 表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A TP13 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于 -20 $^{\circ}$ C 和 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化。

1.2.3 探针标记 参照 Chena *et al*^[25]方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μ g),

Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在 20 μ L 5 × SSC+2 g/L SDS 杂交液中.

1.2.4 芯片制备 芯片包含的 1 152 个 cDNA, 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因、抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000–3 000 bp. 靶基因以 0.5 g/L 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线交联, 再分别用 2 g/L SDS、双蒸水及 2 g/L 硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.5 预杂交 将预杂交液放入 95 °C 水浴锅内变性 2 min, 将待预杂交的芯片放入 95 °C 水浴锅内变性 30 s, 芯片取出后即放入无水乙醇中 30 s, 晾干. 将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内, 盖上盖玻片, 放入杂交箱内 42 °C 预杂交 5–6 h.

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于 95 °C 水浴中变性 2 min; 芯片置于 95 °C 水浴中变性 30 s, 芯片取出浸于无水乙醇 30 s, 探针取出后迅速置于冰上. 将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱中, 用 Parafilm 密封, 放入 42 °C 杂交箱内杂交过夜(16–18 h). 依次以 2 × SSC+2 g/L SDS、1 : 1 000 SSC +2 g/L SDS、1 : 1 000 SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.7 扫描与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.5, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.4, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 总 RNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A_{260}/A_{280} >2.01, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 的电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交体系, 在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 000 个基因中筛选出差异表达基因共 86 条, 占 8.6%, 其中 46 条基因表达增强, 40 条基因表达降低.

2.3 差异表达基因分析 部分表达增强的基因(表 1). 部分表达降低的基因(表 2).

表 1 部分表达显著增加的基因

编号	Cy5/ Cy3	编码蛋白
1	2.512	酪蛋白激酶 1a1 (CSNK1A1)
2	2.516	RNA 结合基序蛋白 6 (RBM6)
3	2.526	磷脂酶 B1 (LYPLA1)
4	2.568	细胞骨架相关蛋白
5	2.579	神经紧张肽(NTS)
6	2.579	翻译抑制蛋白 p14.5 (UK114)
7	2.602	转化生长因子 β II 受体 α
8	2.612	氯离子通道 /p53 调节器官氯离子通道蛋白 4 (CLIC4)
9	2.618	RB 结合蛋白
10	2.618	低密度脂蛋白相关蛋白 2 (LRP2)
11	2.620	黑素瘤缺乏因子 2 (AIM2)
12	2.636	乳酸脱氢酶 B
13	2.656	泛素特异性蛋白酶 11 (USP1)
14	2.657	肿瘤高表达因子(HEC)富含亮氨酸重复序列
15	2.689	调节因子 X2, 影响人类组织相容性抗原 II 表达
16	2.708	cAMP 依赖性蛋白激酶催化亚单位 β (PRKACB)
17	2.770	选择素 2 (CUL2)
18	2.789	鲨烯环氧化酶(SQLE), mRNA
19	2.793	Ran 结合蛋白 2 (RanBP2alpha)
20	2.821	凋亡蛋白 1 抑制因子 (MIHC)
21	2.870	DnaJ 类热休克蛋白 40(HLJ1)
22	2.904	低电压依赖性钙离子通道 α 1 亚单位
23	2.918	alkB 分子类似物
24	2.954	转录因子 7 (TCF7)
25	2.965	甾醇 C5 脱氢酶(SC5DL), mRNA
26	2.979	亚铁螯合酶
27	3.021	嗜乳脂蛋白亚家族 2 成员 A2(BTN2A2)
28	3.087	钾离子电压门控通道 KQT 样亚家族成员 3
29	3.110	脆性 X 精神迟滞蛋白 1(FMR1)
30	3.119	FYN 结合蛋白(FYB-120/130)
31	3.323	包含 WD 重复序列的 SOCS 盒
32	3.457	细胞分裂周期蛋白 23 (CDC23)
33	3.755	造血细胞特异性 Lyn 底物 1 (HCLS1)
34	4.025	γ 氨基丁酸 α 受体 γ 2
35	4.053	FK506 结合相关蛋白(FAP48)转录子
36	5.609	cAMP- 依赖性蛋白激酶调节亚单位 II β (PRKAR2B)

表2 部分表达显著降低的基因

编号	Cy5/ Cy3	编码蛋白
1	0.243	核糖体蛋白 L32 (RPL32)
2	0.253	突触素样蛋白(SYPL), mRNA
3	0.274	基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP1)
5	0.280	层粘连蛋白 $\beta 2$ (LAMB2)
6	0.282	谷胱甘肽过氧化物酶 1 (GPX1)
7	0.282	BRCA2 和 CDKN1A 相互作用蛋白(BCCIP)转录本 C
8	0.316	转化生长因子 $\beta 1$ (TGFB1)
9	0.322	热休克蛋白 70(HSPA9B)
10	0.338	小 RNA 活化复合物, 多肽 1
11	0.352	微管相关蛋白, RP/EB 家族成员 2(MAPRE2)
12	0.354	CD79A 结合蛋白 1 (IGBP1),
13	0.355	乙酰辅酶 A 氧化酶 1 样蛋白
14	0.357	蛋白磷酸激酶 1 催化亚单位 α 型
15	0.359	核仁蛋白
16	0.364	蜡样脂质褐素
17	0.364	钙调素结合蛋白 1 (CALD1)
18	0.369	金属硫蛋白 3(MT3)
19	0.369	假想 IL-16 蛋白前体
20	0.370	肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合物亚单位 3 (ARPC3)
21	0.374	层粘连蛋白 B 受体
22	0.374	有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 2(MAP3K2)
23	0.377	环指蛋白和肿瘤坏死因子受体相关蛋白
24	0.383	肿瘤坏死因子受体相关蛋白 2 (TRAF2)
25	0.384	ADP 核糖基转移酶样 1 (ADPRTL1)
26	0.390	谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)
27	0.391	鸟苷酸环化酶 1 $\alpha 3$ (GUCY1A3)
28	0.392	有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 3 (MAP4K3)
29	0.393	亮氨酸拉链
30	0.394	富含半胱氨酸血管生成诱导因子 (CYR61)
31	0.397	核糖体蛋白 S10
32	0.400	钙联接蛋白(CANX)

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)感染与肝纤维化及肝细胞癌(HCC)的发生密切相关, 其中病毒基因编码的非结构蛋白 NS5A 起着重要的作用. HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白的羧基末端, 是丝氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58. NS5A 是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征. 研究发现^[26]NS5A 蛋白通过双链 RNA- 活化蛋白激酶结合域与病毒复制、干扰素抵抗、细胞生长的限制有一定关系, 但是对结合域在疾病发展过程中的作用的认识是很有限的, 有待于进一步研究. 具有易变性特质的 NS5A 在感染 HCV 的自然病程中维持稳定, 表明其可能在病毒的生活周期中扮演中心角色. 一般来说, 转录的反式

激活因子是在细胞核中起作用的, 而 NS5A 定位于细胞内质网, 因此推测 NS5A 可能参与了细胞信号传导途径. NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用^[27]. Ghosh *et al*^[28]研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21WAF1, 激活人肝癌细胞中增生细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. NS5A cDNA能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 这一证据直接证明了 HCV NS5A 蛋白的恶性转化潜能.

NS5ATP13是我室利用 SSH 从分别转染真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A 和 pcDNA3.1(-)空载体的 HepG2 细胞中筛选出来的 NS5A 上调的未知功能蛋白基因, 我们应用基因表达谱芯片技术筛选 NS5ATP13 反式调节基因, 发现 NS5ATP13 可显著影响 HepG2 细胞基因表达谱, 得到 86 条显著差异表达基因, 包括已知和未知功能基因, 分别与细胞生长、分化、凋亡等相关.

结果表明 NS5ATP13 可上调 Ran 结合蛋白 2(RanBP2)、凋亡蛋白 1 抑制因子(IAP-1, MIHC, cIAP2)、细胞分裂周期蛋白 23(CDC23)等. RanBP2 作为核孔复合物的组成成分, 在细胞核内外的物质转运中发挥着重要的作用, Forler *et al*^[29]敲除果蝇细胞中的 RanBP2, 发现细胞增生和 mRNA 向核外转运均受到抑制. Gordon *et al*^[30]研究发现 IAP-1 在恶性胸膜间皮瘤细胞中高表达. Lee *et al*^[31]研究发现 CDC23 通过聚集 Dfp1-Hsk1 激酶及刺激小染色体维护蛋白的磷酸化参与复制前体复合物的活化过程. NS5ATP13 可能通过上调这些凋亡相关因子抑制细胞凋亡, 从而引起肿瘤的发生. cAMP 依赖性蛋白激酶(PKA)可作用于多种与糖脂代谢有关的酶类、一些离子通道和某些转导因子, 使他们发生磷酸化而改变其活性状态. 垂体腺苷酸环化酶激活肽被 PKA 激活后, 可引起细胞膜的持续去极化, 发挥抗凋亡的效应, 其中, 钾离子通道的活化在程序性细胞死亡中扮演了重要的角色^[32]. NS5ATP13 通过上调 PKA 和钾离子电压门控通道 KQT 样亚家族成员 3, 也可能是抑制凋亡发生的机制之一. 同时, 渗透压应激、炎症细胞因子、脂多糖(LPS)、紫外线、生长因子等细胞应激可以激活 p38 MAPK 信号转导途径, 而有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 2(MAP3K2)通过 p38 MAPK 信号转导途径可激活胱冬肽酶 -3, 诱导细胞凋亡^[33]. MAP3K 还可磷酸化 IKK (I κ B kinase). IKK 是一种丝/苏氨酸蛋白酶, 活化后可以磷酸化 I κ B, 进而释放出活化的 NF- κ B, 使其进入细胞核内发挥转录因子的功能^[34]. NS5ATP13 下调多种诱导细胞凋亡的信号分子, 可能在肝细胞癌的发生机制中起到一定的作用.

基质金属蛋白酶抑制剂 1(TIMPI)作为胶原酶抑制剂, 抑制 I 型, II 型, III 型胶原分解, 在肝纤维化的发生发展过程中起到重要作用^[35]. 转化生长因子 $\beta 1$

(TGF β 1)可诱导黏附分子CD44, CD49b, CD49, CD51, CD54和CD61以及细胞外基质成分纤维连接蛋白, 层粘连蛋白和IV型胶原的表达^[36]. NS5ATP13通过下调TIMP1、TGF β 1、层粘连蛋白 β 2 (LAM β 2)是否可以抑制肝纤维化的发生和发展, 其作为感染HCV的机体保护机制有待于进一步研究. NS5ATP13除了与已知蛋白基因相互作用外, 尚可作用于一些未知功能基因, 例如可下调假想蛋白AF038182, 其生物学功能以及该假想基因的结构和功能有待于进一步研究.

总之, 利用基因芯片高通量多角度系统地进行基因特征分析, 为我们从一个全新的视角认识靶基因NS5ATP13和HCV非结构蛋白NS5A的分子生物学功能、HCV的致病机制和肝纤维化及肝癌的发病机制打下了重要基础.

4 参考文献

- Zandman-Goddard G, Levy Y, Weiss P, Shoenfeld Y, Langevitz P. Transverse myelitis associated with chronic hepatitis C. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:111-113
- Moriguchi H, Kobayashi M, Chung RT, Sato C. Optimal IFN therapy for 40-year-old patients with severe HCV-1b infection. *Gastroenterology* 2003;124:1166-1167
- Chowdhury A, Santra A, Chaudhuri S, Dhali GK, Chaudhuri S, Maity SG, Naik TN, Bhattacharya SK, Mazumder DN. Hepatitis C virus infection in the general population: A community-based study in west bengal, India. *Hepatology* 2003;37:802-809
- Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. Racial differences in the relationship between hepatitis C infection and iron stores. *Hepatology* 2003;37:795-801
- Ryu KJ, Kim JH, Lee SW. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol Ther* 2003;7:386-395
- Kasuno K, Ono T, Matsumori A, Nogaki F, Kusano H, Watanabe H, Yodoi J, Muso E. Hepatitis C virus-associated tubulointerstitial injury. *Am J Kidney Dis* 2003;41:767-775
- Chen S, Wang Y. Genetic variation characteristics of the envelope region of hepatitis C virus in the patients with chronic hepatitis. *Zhonghua Shiyao He Linchuang Bingdixue Zazhi* 2002;16:219-222
- Hui CK, Belaye T, Montegrande K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-517
- Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Lepar G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion* 2003;43:541-544
- Sunagawa H, Takayama H, Yamashiro T, Sasaki H, Sashida Y, Matsuura K, Kayou M. Hepatocellular carcinoma in a patient with primary biliary cirrhosis and seronegativity for markers of hepatitis B virus and hepatitis C virus: report of a case. *Surg Today* 2003;33:219-223
- Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999;30:1004-1013
- Zech B, Kurtenbach A, Krieger N, Strand D, Blencke S, Morbitzer M, Salassidis K, Cotten M, Wissing J, Obert S, Bartenschlager R, Herget T, Daub H. Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Gen Virol* 2003;84:555-560
- Georgopoulou U, Caravokiri K, Mavromara P. Suppression of the ERK1/2 signaling pathway from HCV NS5A protein expressed by herpes simplex recombinant viruses. *Arch Virol* 2003;148:237-251
- Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and 53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 2002;76:11079-11090
- Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chr via J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
- 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 刘妍, 段惠娟, 成军, 王建军, 陆荫英, 牟劲松, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活SV40病毒启动子的研究. 军医进修学院学报 2003;28:40-42
- 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- Jain KK. Current trends in molecular diagnostics. *Med Device Technol* 2002;13:14-18
- Ruano JM, Glidle A, Cleary A, Walmsley A, Aitchison JS, Cooper JM. Design and fabrication of a silica on silicon integrated optical biochip as a fluorescence microarray platform. *Biosens Bioelectron* 2003;18:175-184
- Chena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- Franco S, Gimenez-Barcons M, Puig-Basagoiti F, Furci I, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Saiz JC. Characterization and evolution of NS5A quasispecies of hepatitis C virus genotype 1b in patients with different stages of liver disease. *J Med Virol* 2003;71:195-204
- Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- Forler D, Rabut G, Ciccarelli FD, Herold A, Kocher T, Niggeweg R, Bork P, Ellenberg J, Izaurralde E. RanBP2/Nup358 provides a major binding site for NXF1-p15 dimers at the nuclear pore complex and functions in nuclear mRNA export. *Mol Cell Biol* 2004;24:1155-1167
- Gordon GJ, Appasani K, Parcells JP, Mukhopadhyay NK, Jaklitsch MT, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R. Inhibitor of apoptosis protein-1 promotes tumor cell survival in mesothelioma. *Carcinogenesis* 2002;23:1017-1024
- Lee JK, Seo YS, Hurwitz J. The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2334-2339
- Mei YA, Vaudry D, Basille M, Castel H, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I_k in the anti-apoptotic action of PACAP. *Eur J Neurosci* 2004;19:1446-1458

- 33 Pearl-Yafe M, Halperin D, Scheuerman O, Fabian I. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67:539-546
- 34 Schmidt C, Peng B, Li Z, Sclabas GM, Fujioka S, Niu J, Schmidt-Supprian M, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2003;12:1287-1300
- 35 Hsu YC, Chiu YT, Lee CY, Lin YL, Huang YT. Increases in fibrosis-related gene transcripts in livers of dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2004;11:408-417
- 36 Schierano G, Bellone G, Manzella C, Preti G, Emanuelli G. In vitro effect of transforming growth factor-beta on adhesion molecule expression by human gingival fibroblasts cultured in the presence of a titanium abutment. *J Periodontol* 2001;72:1658-1665

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对 IGF- I、IGF- II 表达的影响

何必立, 吕 宾, 徐 毅, 苗 青, 范一宏

何必立, 浙江省台州医院消化科 浙江省临海市 317000
吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏, 浙江省中医院消化科 浙江省杭州市 310006
项目负责人: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市, 浙江省中医院消化科
lvbin@medmail.com.cn
电话: 0571-87032028 传真: 0571-87077785
收稿日期 2004-08-30 接受日期: 2004-09-25

摘要

目的: 探讨温郁金对人胃癌细胞SGC-7901的抑制作用及其作用机制。

方法: 采用超临界二氧化碳萃取法提取温郁金挥发油成分。以氟尿嘧啶(5-Fu)为阳性对照药物, 采用MTT法, 测定温郁金提取物对体外培养胃癌细胞SGC-7901增生的影响; 应用放射免疫测定法分析温郁金提取物对细胞培养液中IGF- I、IGF- II 浓度水平的影响。

结果: 超临界二氧化碳萃取法提取温郁金获得温郁金提取物1和提取物2。温郁金提取物1、提取物2对胃癌细胞的生长有显著的抑制作用(均 $P < 0.01$), 且抑制率随药物浓度的升高而增高, 存在明显的量效关系。200 mg/L浓度的温郁金提取物1和提取物2对胃癌细胞生长的抑制率分别为64.44%、60.80%, 在这个浓度水平, 其抑制肿瘤细胞生长作用与阳性对照药物5-Fu效果相当。温郁金提取物1、提取物2能降低胃癌细胞培养液中IGF- I、IGF- II 的浓度水平(均 $P < 0.05$)。

结论: 温郁金提取物对人胃癌细胞SGC-7901生长有抑制作用, 其抑癌作用的机制可能与抑制胃癌细胞分泌IGF- I、IGF- II 有关。

何必立, 吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏. 温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对IGF- I、IGF- II 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2761-2763
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2761.asp>

0 引言

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)同肿瘤的关系近年来受到了广泛的关注^[1]。温郁金具有行气破血、消积止痛等作用, 是抗肿瘤复方中常见的药物, 前期在其抗肿瘤作用方面已有报道^[2], 但有关其对胰岛素样生长因子的影响研究鲜见。我们研究温郁金提取物对体外培养的胃癌细胞株SGC-7901的抑制作用, 并从其对胰岛素样生长因子 I (IGF- I)、胰岛素样生长因子 II (IGF- II)分泌的影响来分析其作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 胃腺癌细胞(SGC-7901)株(购自中科院上海细胞所), RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司, 噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶为上海生物工程公司产品, 氟尿嘧啶(5-Fu)为上海旭东海普药业有限公司产品, IGF- I 放免试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司, IGF- II 放免试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所, 二甲基亚砜为浙江杭州双林化工试剂厂产品, 温郁金购自浙江省中医院中药房, HA121-50-01型超临界萃取装置为江苏南通华安超临界实业公司产品, CO₂ 细胞培养箱为美国 Thermo Forma 公司产品, ELX800 酶标仪为美国 Bio-Tek 公司生产, SN-682 放射免疫γ计数器由中科院上海原子核研究所日环仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SGC-7901 细胞常规培养于含 100 mL/L 灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置 37 °C、50 mL/L 的 CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养。

- 33 Pearl-Yafe M, Halperin D, Scheuerman O, Fabian I. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67:539-546
- 34 Schmidt C, Peng B, Li Z, Sclabas GM, Fujioka S, Niu J, Schmidt-Supprian M, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2003;12:1287-1300
- 35 Hsu YC, Chiu YT, Lee CY, Lin YL, Huang YT. Increases in fibrosis-related gene transcripts in livers of dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2004;11:408-417
- 36 Schierano G, Bellone G, Manzella C, Preti G, Emanuelli G. In vitro effect of transforming growth factor-beta on adhesion molecule expression by human gingival fibroblasts cultured in the presence of a titanium abutment. *J Periodontol* 2001;72:1658-1665

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对 IGF- I、IGF- II 表达的影响

何必立, 吕 宾, 徐 毅, 苗 青, 范一宏

何必立, 浙江省台州医院消化科 浙江省临海市 317000
吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏, 浙江省中医院消化科 浙江省杭州市 310006
项目负责人: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市, 浙江省中医院消化科.
lvbin@medmail.com.cn
电话: 0571-87032028 传真: 0571-87077785
收稿日期: 2004-08-30 接受日期: 2004-09-25

摘要

目的:探讨温郁金对人胃癌细胞SGC-7901的抑制作用及其作用机制。

方法:采用超临界二氧化碳萃取法提取温郁金挥发油成分。以氟尿嘧啶(5-Fu)为阳性对照药物, 采用MTT法, 测定温郁金提取物对体外培养胃癌细胞SGC-7901增生的影响; 应用放射免疫测定法分析温郁金提取物对细胞培养液中IGF- I、IGF- II 浓度水平的影响。

结果:超临界二氧化碳萃取法提取温郁金获得温郁金提取物1和提取物2。温郁金提取物1、提取物2对胃癌细胞的生长有显著的抑制作用(均 $P < 0.01$), 且抑制率随药物浓度的升高而增高, 存在明显的量效关系。200 mg/L浓度的温郁金提取物1和提取物2对胃癌细胞生长的抑制率分别为64.44%、60.80%, 在这个浓度水平, 其抑制肿瘤细胞生长作用与阳性对照药物5-Fu效果相当。温郁金提取物1、提取物2能降低胃癌细胞培养液中IGF- I、IGF- II 的浓度水平(均 $P < 0.05$)。

结论:温郁金提取物对人胃癌细胞SGC-7901生长有抑制作用, 其抑癌作用的机制可能与抑制胃癌细胞分泌IGF- I、IGF- II 有关。

何必立, 吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏. 温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对IGF- I、IGF- II 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2761-2763
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2761.asp>

0 引言

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)同肿瘤的关系近年来受到了广泛的关注^[1]。温郁金具有行气破血、消积止痛等作用, 是抗肿瘤复方中常见的药物, 前期在其抗肿瘤作用方面已有报道^[2], 但有关其对胰岛素样生长因子的影响研究鲜见。我们研究温郁金提取物对体外培养的胃癌细胞株SGC-7901的抑制作用, 并从此对胰岛素样生长因子 I (IGF- I)、胰岛素样生长因子 II (IGF- II)分泌的影响来分析其作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 胃腺癌细胞(SGC-7901)株(购自中科院上海细胞所), RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司, 噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶为上海生物工程公司产品, 氟尿嘧啶(5-Fu)为上海旭东海普药业有限公司产品, IGF- I 放免试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司, IGF- II 放免试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所, 二甲基亚砜为浙江杭州双林化工试剂厂产品, 温郁金购自浙江省中医院中药房, HA121-50-01型超临界萃取装置为江苏南通华安超临界实业公司产品, CO₂ 细胞培养箱为美国 Thermo Forma 公司产品, ELX800 酶标仪为美国 Bio-Tek 公司生产, SN-682 放射免疫γ计数器由中科院上海原子核研究所日环仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SGC-7901 细胞常规培养于含 100 mL/L 灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置 37 °C、50 mL/L 的 CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养。

1.2.2 温郁金提取物的制备 采用超临界CO₂流体萃取技术提取温郁金有效成分。萃取温度 40 °C, 压力 3×10^7 Pa, 时间为 120 min/循环, CO₂ 流量为 50 kg/h, 分离 1 的反应条件为: 压力 1.25×10^7 Pa, 温度 50 °C; 分离 2 的反应条件为压力 5.5×10^6 Pa, 温度 40 °C。获温郁金提取物 1、温郁金提取物 2 后 4 °C 避光冷藏保存。药物在使用前新鲜配制, 先用适量 DMSO 溶解, 再以 RPMI-1640 培养液进行稀释, 使其浓度达到用药需求。

1.2.3 细胞增生抑制试验(MTT 还原法) 对数生长期细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养液调整细胞悬液浓度为 1.0×10^7 /L 接种细胞于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L, 置 37 °C、50 mL/L CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养; 24 h 后, 更换不含胎牛血清的 1640 培养液再培养 24 h, 使细胞同步化; 换上含浓度依次为 25、50、100、200 mg/L 温郁金提取物 1、提取物 2 的完全培养液, 阴性对照组为不含温郁金的培养液, 空白对照组不含细胞, 阳性对照组加入含浓度依次为 25、50、100、200 mg/L 的 5-Fu 的完全培养液, 每个药物浓度设 6 个复孔; 分别继续培养 48 h; 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μ L, 37 °C 孵育 4 h, 再加入 150 μ L DMSO, 上微量振荡器振荡 10 min, 立即用酶标仪测定 490 nm 波长吸光度值(A)。

抑制率(%) = [(阴性对照 A - 空白 A) - (实验 A - 空白 A)] / (阴性对照 A - 空白 A) \times 100%

1.2.4 条件培养液中 IGF- I、IGF- II 含量的测定 对数生长期细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养液调整细胞悬液浓度为 5.0×10^7 /L, 接种细胞于 24 孔培养板中, 每孔 1 000 μ L, 37 °C、50 mL/L CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养; 24 h 后, 更换不含胎牛血清的 1640 培养液再培养 24 h, 使细胞同步化; 换上含浓度依次为 25、50、100 mg/L 温郁金提取物 1、提取物 2 的完全培养基, 阴性对照组细胞更换为 1 000 μ L 完全培养基, 分别继续培养 48 h, 收集各处理组培养液。按照 IGF- I、IGF- II 放免试剂盒的说明步骤测定培养液中 IGF- I 和 IGF- II 浓度, 由自动 γ 计数器预先编制的程序(以 B-NSB/B0-NSB 计算标准及待测样品结合百分率, 半对数绘制标准曲线)直接给出有关参数、标准曲线和样品浓度。

统计学处理 结果以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 组间比较采用方差分析, 量效关系采用相关与回归分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 温郁金对SGC-7901细胞增值的影响 温郁金提取物 1、提取物 2 随剂量的增加, 其对胃癌细胞的抑制率也增加(图 1, 表 1), 有显著相关性(P 均 <0.01)。200 mg/L 的温郁金提取物 1、提取物 2 和对照药物 5-Fu 对胃癌细胞株生长的抑制作用无显著差异($P > 0.05$), 其抑制作用相当。

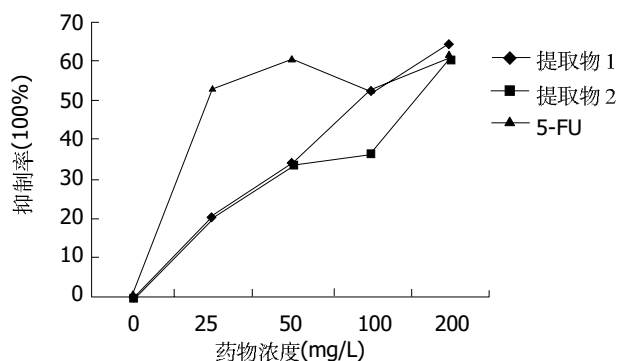


图 1 不同浓度药物对胃癌细胞生长的影响。

表 1 不同药物对胃癌细胞生长的影响

处理组	药物浓度(mg/L)	n	A 值	细胞抑制率(%)
提取物 1	200	6	0.2752 \pm 0.0242 ^b	64.44
提取物 1	100	6	0.3547 \pm 0.0332 ^b	51.59
提取物 1	50	6	0.4697 \pm 0.0270 ^b	33.00
提取物 1	25	6	0.5492 \pm 0.0278 ^b	20.15
提取物 2	200	6	0.2977 \pm 0.0075 ^d	60.80
提取物 2	100	6	0.4493 \pm 0.0291 ^d	36.29
提取物 2	50	6	0.4678 \pm 0.0111 ^d	33.30
提取物 2	25	6	0.5582 \pm 0.0330 ^d	18.70
5-Fu 对照组	200	6	0.2920 \pm 0.0146 ^f	61.72
5-Fu 对照组	100	6	0.3492 \pm 0.0210 ^f	52.48
5-Fu 对照组	50	6	0.2978 \pm 0.0270 ^f	60.78
5-Fu 对照组	25	6	0.3448 \pm 0.0274 ^f	53.18
阴性对照组	0	6	0.6738 \pm 0.0559	0

^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$, ^f $P < 0.01$ vs 阴性对照组。

2.2 温郁金对胃癌细胞培养液中 IGF- I、IGF- II 含量的影响 和对照组相比, 25、50、100 mg/L 浓度的温郁金提取物 1、提取物 2 对胃癌细胞培养液中 IGF- I 及 IGF- II 的含量均有较明显的下调作用 (P 均 <0.01 , 表 2)。

表 2 温郁金对胃癌细胞培养液中 IGF- I、IGF- II 浓度的影响

处理组	药物浓度(mg/L)	n	IGF- I 含量(ug/L)	IGF- II 含量(ug/L)
对照组	0	4	28.2160 \pm 2.0554	0.1818 \pm 0.0504
提取物 1	25	4	13.5133 \pm 3.1200 ^b	0.1223 \pm 0.0219 ^e
提取物 1	50	4	10.5938 \pm 4.2190 ^b	0.1058 \pm 0.0067 ^f
提取物 1	100	4	7.6120 \pm 3.6616 ^b	0.0815 \pm 0.0211 ^f
提取物 2	25	4	20.0393 \pm 2.6845 ^c	0.1253 \pm 0.0192 ^b
提取物 2	50	4	15.6623 \pm 3.4037 ^d	0.1168 \pm 0.0122 ^b
提取物 2	100	4	12.7520 \pm 2.7613 ^d	0.0803 \pm 0.0095 ⁱ

^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$, ^g $P < 0.05$, ^h $P < 0.01$ vs 对照组。

3 讨论

超临界CO₂萃取技术是近20 a来在国际上取得迅速发展的化工分离技术, 在中药有效成分提取方面有诸多优

势^[3]. 我们运用超临界 CO₂ 萃取技术, 从温郁金中提取出其药用成分, 根据提取条件不同, 获得提取物 1、提取物 2, 所设定萃取条件大致相当于以乙醇和乙醚萃取所得, 提取物 1 主要含姜黄素, 而提取物 2 主要为挥发油成分. MTT 结果显示, 和阴性对照组比较, 浓度范围为 25–200 mg/L 的温郁金提取物 1、提取物 2 对 SGC-7901 均有显著的抑制作用 (P 均 < 0.05), 且有明显的量效关系.

以往温郁金中抗肿瘤成分研究较多的有两大类成分, 即姜黄素和挥发油. 研究者从直接细胞毒作用, 诱导细胞凋亡, 诱导肿瘤细胞分化等多个角度进行了其抗肿瘤作用机制的探讨^[2,4], 但针对细胞生长因子的研究少见.

胰岛素样生长因子系统 (IGFs) 由胰岛素样生长因子 I (IGF-I)、胰岛素样生长因子 II (IGF-II)、他们相应的受体 IGF-IR、IGF-IIR 及其 6 种胰岛素样生长因子相关蛋白 (IGFBPs) 组成. IGF-I 对各种细胞活动既有即刻作用又有远期影响, 而这些作用的发挥依赖于其和 IGF-IR 的结合. IGF-I 通过刺激细胞糖原和蛋白合成以及增强细胞摄取氨基酸和葡萄糖的能力而直接促进细胞蛋白质和碳水化合物代谢^[5]. IGF-I 也对细胞增生、分化、凋亡有间接的影响. 对很多细胞系而言, IGF-I 是强有力的有丝分裂促进剂, 他可通过增加 DNA 合成、上调细胞周期蛋白 D1 表达, 从而加速细胞从 G1 期向 S 期过渡^[6-7]. 另外, IGF-I 又通过上调 Bcl 蛋白表达, 下调 Bax 蛋白表达而提高 Bcl/Bax 二聚体含量, 这一变化可封闭细胞凋亡程序的启动^[8-9]. 同样, IGF-II 也具有促有丝分裂、抗细胞凋亡、促进细胞增生和分化作用.

鉴于 IGFs 在细胞增生、分化、凋亡、突变等过程中起着重要的作用, 最近数十年人们对 IGFs 在肿瘤细胞生长和发展中的作用进行了大量的研究, 结果表明: IGFs 与多种肿瘤包括白血病细胞、肉瘤、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、肠癌、肝癌、胰腺癌、肾癌等各种肿瘤的发生发展关系密切^[10-11]. IGFs 和胃癌的关系最初在体外细胞实验中被观察到, Thompson *et al*^[12] 在 1990 年报道在人胃癌细胞系 LIM-1839 中存在 IGF-II 的自分泌. Chung and Antoniades^[13] 于 1992 年用原位杂交法在 3 个人胃癌标本中检测到 IGF-I mRNA 的表达.

IGFs 和 IGF-IR 的结合激活酪氨酸激酶的活性, 从而促发一系列分子介导的信号转导级联反应. 目前已经清楚的信号转导途径有两个, 其一途径为激活 Ras 蛋白、Raf 蛋白和有丝分裂活化的蛋白激酶. 另一途径为激活三磷酸腺苷激酶而发挥作用^[5]. 除和 IGFs 结合而调节细胞有丝分裂和凋亡过程外, IGF-IR 还和细胞转化相关. 体外实验表明从细胞膜表明除去 IGF-IR 基因后, 可抑制细胞的转化^[14]. IGF-IIR 可通过和 IGF-II 结合而降低 IGF-II 的生物学活性.

鉴于 IGF 在肿瘤发生发展中的作用意义, 有学者采用阻断 IGF 的方法对肿瘤进行治疗, 方法有两种: 第

一, 阻断 IGF 的合成或分泌; 第二, 阻断 IGF 与受体的结合, 应用这些方法, 已取得了初步的效果^[15].

为了探讨温郁金提取物是否抑制胃癌细胞分泌 IGF, 我们采用放射免疫测定法检测不同浓度温郁金提取物 1、提取物 2 对胃癌细胞培养液中 IGF-I、IGF-II 含量的影响. 结果提示, 25、50、100 mg/L 温郁金两种提取物对胃癌细胞培养液中 IGF-I、IGF-II 含量均有显著的下调 (P 均 < 0.05), 提示温郁金可能通过影响胃癌细胞 IGF 的分泌起到抗肿瘤作用的.

温郁金对肿瘤细胞的调控机制复杂, 我们的研究仅提示温郁金提取物对体外培养的 SGC-7901 具有抑制其增生作用; 抑制胃癌细胞分泌 IGF-I 和 IGF-II 可能是其作用机制的一方面, 温郁金对胃癌细胞 IGF-I 和 IGF-II 基因表达及其受体的影响有待于进一步深入研究.

另外, 我们的研究中提取物化学成分不明确, 有待于进一步分离纯化, 但温郁金资源丰富, 在胃癌的化学防治中值得深入研究.

4 参考文献

- 1 Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000;21:215-244
- 2 王琰, 王慕邹. 姜黄属常用中药的研究进展. *中国药学杂志* 2001; 36:80-84
- 3 毛中兴, 赖炳森. 超临界二氧化碳技术在中药有效成分萃取中的应用. *北京中医* 2001;1:34-35
- 4 李国栋, 许付, 沈爱军. 莪术油的研究进展. *中国药学杂志* 2002; 37:806-809
- 5 Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34
- 6 Furlanetto RW, Harwell SE, Frick KK. Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells *in vitro*. *Mol Endocrinol* 1994;8:510-517
- 7 Dufourny B, Alblas J, van Teeffelen HA, van Schaik FM, van der Burg B, Steenbergh PH, Sussenbach JS. Mitogenic signaling of insulin-like growth factor I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:31163-31171
- 8 Parrizas M, LeRoith D. Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 1997;138:1355-1358
- 9 Wang L, Ma W, Markovich R, Lee WL, Wang PH. Insulin-like growth factor I modulates induction of apoptotic signaling in H9C2 cardiac muscle cells. *Endocrinology* 1998;139:1354-1360
- 10 LeRoith D, Baserga R, Helman L, Roberts CT Jr. Insulin-like growth factors and cancer. *Ann Intern Med* 1995;122:54-59
- 11 Macaulay VM. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 1992;65:311-320
- 12 Thompson MA, Cox AJ, Whitehead RH, Jonas HA. Autocrine regulation of human tumor cell proliferation by insulin-like growth factor-II: an *in vitro* model. *Endocrinology* 1990;126:3033-3042
- 13 Chung CK, Antoniades HN. Expression of c-sis platelet derived growth factor-B, insulin-like growth factor-I and transforming growth factor messenger RNA and their respective receptor messenger RNA in primary human gastric carcinomas: *in vivo* studies with *in situ* hybridization and Immunocytochemistry. *Cancer Res* 1992;52:3453-3459
- 14 Oates AJ, Schumaker LM, Jenkins SB, Pearce AA, DaCosta SA, Arun B, Ellis MJ. The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47:269-281
- 15 Huynh HT, Tetenes E, Wallace L, Pollak M. *In vivo* inhibition of insulin-like growth factor 1 gene expression by amoxifen. *Cancer Res* 1993;53:1727-1730

中药健脾康复方对大肠癌脾虚证患者K-ras和p53基因突变的抑制作用

杨传标, 薛军, 张德春, 徐克成, 左建生

杨传标, 张德春, 徐克成, 左建生, 广州复大肿瘤医院中西医结合科
广东省广州市 510300

薛军, 广州中医药大学科技处 广东省广州市 510405

广东省中医药局立项资助项目, No. 102009

项目负责人: 薛军, 510405, 广东省广州市, 广州中医药大学科技处,
xuejun1969@hotmail.com

电话: 020-33320278

收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-07-27

摘要

目的: 研究中药健脾康复方对大肠癌脾虚证患者K-ras和p53基因突变的抑制作用。

方法: 选择中晚期大肠癌患者45例, 随机分为治疗组和对照组。治疗组30例, 在对症支持治疗的基础上口服健脾康复方, 每日1剂, 对照组15例, 只给予对症支持治疗, 疗程为2 mo。观察治疗前后外周血K-ras基因突变率和血清突变型p53基因蛋白含量的变化。

结果: 治疗组患者外周血K-ras基因突变率治疗后为26.7% (8/30), 较治疗前的73.3% (22/30)显著下降 ($P < 0.05$); 治疗组患者血清突变型p53基因蛋白含量治疗后 (0.82 ± 0.24 ng/L) 较治疗前 (0.89 ± 0.21 ng/L)显著下降 ($t = 2.34$, $P < 0.05$)。对照组以上两项指标治疗前后差异无显著意义。

结论: 中药健脾康复方具有抑制K-ras和p53基因突变的作用。

杨传标, 薛军, 张德春, 徐克成, 左建生. 中药健脾康复方对大肠癌脾虚证患者K-ras和p53基因突变的抑制作用. 世界华人消化杂志 2004;12(11): 2764-2765

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2764.asp>

0 引言

大肠癌的发生发展是涉及多个基因异常表达的复杂过程, 调节相关基因表达对大肠癌的防治有重要意义。健脾康复汤治疗大肠癌脾虚证, 在改善临床症状和提高免疫功能方面有确切疗效^[1]。我们观察健脾康复汤对大肠癌相关基因K-ras和p53突变的抑制作用, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 诊断参照《新编常见恶性肿瘤诊疗规范大肠癌分册》^[2], 经病理学确诊, 脾虚证辨证参照《中药新药临床研究指导原则》^[3], 我们选择不能手术根治的大肠癌脾虚证中晚期患者45例, 如接受放疗或化疗, 需结束2 mo以上, 且体力状况评分在60分以上, 估

计生存期超过3 mo。凡合并心、肝、肾或造血系统等严重原发疾病者不列入本研究。所有入选病例以随机原则分为治疗组30例, 男16例, 女14例; 年龄30-65岁, 平均年龄 52 ± 9 岁; 临床病理Ⅱ期3例, Ⅲ期13例, Ⅳ期12例。对照组15例, 男9例, 女6例; 年龄33-65岁, 平均年龄 50 ± 11 岁; 临床病理Ⅱ期4例, Ⅲ期6例, Ⅳ期5例。两组性别、年龄、临床病理分期无显著差异 ($P > 0.05$), 具有可比性。以上入选病例于中药治疗前后各抽血1次2份, 一份抗凝, 一份不抗凝。抗凝者用于检测K-ras基因突变率; 不抗凝者分离血清, 用于检测突变型p53基因蛋白含量。

1.2 方法 治疗组口服健脾康复方(由党参30 g、白术15 g、茯苓15 g、仙鹤草15 g、卷柏15 g、甘草5 g)每日1剂, 同时给予常规对症支持治疗。对照组只给予对症支持治疗。疗程为2 mo, 期间不予放疗和化疗等特殊治疗。外周血K-ras基因突变率检测采用QIAamp公司的DNA Blood Midi Kilt提取血浆DNA, 取1 mL血浆加入15 mL离心管内, 用蛋白酶K溶解蛋白, Buffer A W2和无水乙醇分离沉淀DNA, 高速离心下分离出DNA, 离心液-20℃保存。按照两步RFLP-PCR方法^[4]检测血浆K-ras基因突变, 第1次PCR反应体积为50 μL, 引物Pr1和Pr2的序列为TCAAAGAATGGTCCTGGACC和ACTGAATATAAACTTGTGCTAGTTGGACCT。取PCR产物5 μL用限制性内切酶MvaI 1.5 U(加拿大MB公司)进行酶切, 取2 μL酶切产物作为模板, 用0.5 μmol引物Pr2和Pr3(TAATATGTCGACTAAAACAAGATTTACCTC)进行第2次PCR扩增。再用MvaI对第2次PCR产物进行酶切, 酶切后DNA片段在30 g/L琼脂糖凝胶中进行电泳分析, 80V电压1 h, 用Pun-pan1细胞株DNA做阳性对照, SW1990细胞株做阴性对照, 电泳结果在紫外线透射仪下观察, 每个样本至少重复检测2遍。血清突变型p53基因蛋白含量检测采用ELISA法检测, 所用突变p53基因蛋白检测试剂盒为Oncogene公司产品, 检测操作严格按照试剂盒说明进行。以上两项指标均治疗前后各检测1次。

统计学处理 采用SPSS软件进行统计分析, 治疗前后外周血K-ras基因突变率比较用 χ^2 检验, 治疗前后血清突变型p53基因蛋白含量比较用 t 检验。

2 结果

治疗组30例治疗前取外周血检测K-ras基因突变, 阳性16例, 阴性14例, 治疗后重新检测结果阳性8例, 阴

性22例,经 χ^2 检验治疗前后差异有显著意义($P<0.05$).对照组15例治疗前K-ras基因突变阳性者7例,阴性8例,治疗后检测阳性者8例,阴性7例,经 χ^2 检验治疗前后差异无显著意义;治疗组血清突变型p53基因蛋白含量,治疗前为 0.89 ± 0.21 ng/L,治疗后为 0.82 ± 0.24 ng/L,治疗后较治疗前显著下降($t=2.34$, $P<0.05$).对照组血清突变型p53基因蛋白含量治疗前(0.87 ± 0.23 ng/L)后(0.88 ± 0.27 ng/L)差异无显著意义.

3 讨论

祖国医学认为,大肠癌发病的内因是脾虚,在大肠癌本虚标实的病理机制中,脾虚是根本环节,脾虚是大肠癌复发和转移的病理基础.卢振霞 *et al*^[5]研究发现,大肠癌组织中K-ras、p53基因突变者,易发生淋巴结转移,表明K-ras、p53基因突变直接或间接促进了大肠癌的进一步发展及转移.我们检测中晚期大肠癌脾

虚证患者,发现存在K-ras、p53基因突变现象,而经中药健脾康复方治疗1疗程后,外周血K-ras基因突变率下降,血清突变型p53基因蛋白含量亦明显降低.说明K-ras、p53基因突变可能是大肠癌脾虚证的证候特征之一,抑制K-ras、p53基因突变可能是中药健脾康复方对大肠癌脾虚证治疗作用的分子机制.

4 参考文献

- 1 杨传标,殷平善,薛军.中药健脾康复汤治疗大肠癌脾虚证临床疗效观察.河南中医药学刊 2002;17:22-23
- 2 中国抗癌协会.新编常见恶性肿瘤诊治规范大肠癌分册.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1999:23
- 3 中华人民共和国卫生部药政司.中药新药临床研究指导原则(第三辑) 1997:78
- 4 Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, qi Chen X, Anker P, Alstead EM, Ballinger A, Farthing MJ, Stroun M. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998;4:271-275
- 5 卢振霞,孙延霞,侯治富,张秀梅. p53和K-ras基因突变在大肠癌发病中的作用.吉林大学学报(医学版) 2002;28:392-394

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

体外胃电起搏反馈治疗小儿胃食管反流实验与临床研究

李旭,李心元,荣道健

李旭,李心元,荣道健,中国医科大学第二临床学院小儿外科
辽宁省沈阳市 110004

项目负责人:李心元,110004,辽宁省沈阳市,中国医科大学第二临床学院小儿外科. yy_11@sina.com

电话:024-83956508

收稿日期:2004-07-31 接受日期:2004-08-25

摘要

目的:探讨小儿胃食管反流的病因,体外胃电起搏反馈治疗的临床疗效.

方法:通过兔胃排空障碍动物模型及42例胃食管反流患儿进行体外胃电起搏反馈治疗,选择胃电图参数及胃排空率变化为指标,观察治疗效果.

结果:确定胃食管反流患儿的主要病因是胃排空障碍,蠕动节律紊乱,胃幽门窦十二指肠蠕动不协调;胃电起搏反馈治疗后患儿临床症状明显改善,胃排空增快,胃排空率增加($78.8 \pm 6.2\%$, $P<0.05$),半排时间缩短(54.2 ± 9.3 min, $P<0.05$),胃生物电节律趋于正常(餐前 75.4 ± 18.7 次/min,餐后 81.5 ± 17.7 次/min),治疗后患儿餐前、餐后的主功率分别较治疗前明显增

加(2197 ± 2233 , 2448 ± 2136 , $P<0.05$);兔动物模型起搏治疗后胃排空率增加($70.1 \pm 6.2\%$, $P<0.05$),半排时间缩短(105.2 ± 16.3 min, $P<0.05$).

结论:胃电起搏可使胃节律紊乱正常化,促进胃排空,恢复胃幽门窦十二指肠的协调蠕动,是治疗小儿胃食管反流的有效方法.

李旭,李心元,荣道健.体外胃电起搏反馈治疗小儿胃食管反流实验与临床研究.世界华人消化杂志 2004;12(11):2765-2767

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2765.asp>

0 引言

小儿生理性胃食管反流(gastroesophageal reflux, GER)虽然部分患儿可以自愈,但多数病程长而演变成病理性反流造成频繁呕吐,吸入性肺炎,严重者导致患儿发育延迟,甚至窒息猝死等.临床上对本病治疗多采用药物、体位、饮食等保守疗法,效果不好,是国内外研究的前沿课题.我们已通过猪仔^[1]动物模型实验及临床病例观察^[2],认为胃排空障碍、蠕动节律紊乱、胃幽门窦

性22例,经 χ^2 检验治疗前后差异有显著意义($P<0.05$).对照组15例治疗前K-ras基因突变阳性者7例,阴性8例,治疗后检测阳性者8例,阴性7例,经 χ^2 检验治疗前后差异无显著意义;治疗组血清突变型p53基因蛋白含量,治疗前为 0.89 ± 0.21 ng/L,治疗后为 0.82 ± 0.24 ng/L,治疗后较治疗前显著下降($t=2.34$, $P<0.05$).对照组血清突变型p53基因蛋白含量治疗前(0.87 ± 0.23 ng/L)后(0.88 ± 0.27 ng/L)差异无显著意义.

3 讨论

祖国医学认为,大肠癌发病的内因是脾虚,在大肠癌本虚标实的病理机制中,脾虚是根本环节,脾虚是大肠癌复发和转移的病理基础.卢振霞 *et al*^[5]研究发现,大肠癌组织中K-ras、p53基因突变者,易发生淋巴结转移,表明K-ras、p53基因突变直接或间接促进了大肠癌的进一步发展及转移.我们检测中晚期大肠癌脾

虚证患者,发现存在K-ras、p53基因突变现象,而经中药健脾康复方治疗1疗程后,外周血K-ras基因突变率下降,血清突变型p53基因蛋白含量亦明显降低.说明K-ras、p53基因突变可能是大肠癌脾虚证的证候特征之一,抑制K-ras、p53基因突变可能是中药健脾康复方对大肠癌脾虚证治疗作用的分子机制.

4 参考文献

- 1 杨传标,殷平善,薛军.中药健脾康复汤治疗大肠癌脾虚证临床疗效观察.河南中医药学刊 2002;17:22-23
- 2 中国抗癌协会.新编常见恶性肿瘤诊治规范大肠癌分册.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1999:23
- 3 中华人民共和国卫生部药政司.中药新药临床研究指导原则(第三辑) 1997:78
- 4 Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, qi Chen X, Anker P, Alstead EM, Ballinger A, Farthing MJ, Stroun M. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998;4:271-275
- 5 卢振霞,孙延霞,侯治富,张秀梅. p53和K-ras基因突变在大肠癌发病中的作用.吉林大学学报(医学版) 2002;28:392-394

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

体外胃电起搏反馈治疗小儿胃食管反流实验与临床研究

李旭,李心元,荣道健

李旭,李心元,荣道健,中国医科大学第二临床学院小儿外科
辽宁省沈阳市 110004

项目负责人:李心元,110004,辽宁省沈阳市,中国医科大学第二临床学院小儿外科. yy_11@sina.com

电话:024-83956508

收稿日期:2004-07-31 接受日期:2004-08-25

摘要

目的:探讨小儿胃食管反流的病因,体外胃电起搏反馈治疗的临床疗效.

方法:通过兔胃排空障碍动物模型及42例胃食管反流患儿进行体外胃电起搏反馈治疗,选择胃电图参数及胃排空率变化为指标,观察治疗效果.

结果:确定胃食管反流患儿的主要病因是胃排空障碍,蠕动节律紊乱,胃幽门窦十二指肠蠕动不协调;胃电起搏反馈治疗后患儿临床症状明显改善,胃排空增快,胃排空率增加($78.8 \pm 6.2\%$, $P<0.05$),半排时间缩短(54.2 ± 9.3 min, $P<0.05$),胃生物电节律趋于正常(餐前 75.4 ± 18.7 次/min,餐后 81.5 ± 17.7 次/min),治疗后患儿餐前、餐后的主功率分别较治疗前明显增

加(2197 ± 2233 , 2448 ± 2136 , $P<0.05$);兔动物模型起搏治疗后胃排空率增加($70.1 \pm 6.2\%$, $P<0.05$),半排时间缩短(105.2 ± 16.3 min, $P<0.05$).

结论:胃电起搏可使胃节律紊乱正常化,促进胃排空,恢复胃幽门窦十二指肠的协调蠕动,是治疗小儿胃食管反流的有效方法.

李旭,李心元,荣道健.体外胃电起搏反馈治疗小儿胃食管反流实验与临床研究.世界华人消化杂志 2004;12(11):2765-2767

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2765.asp>

0 引言

小儿生理性胃食管反流(gastroesophageal reflux, GER)虽然部分患儿可以自愈,但多数病程长而演变成病理性反流造成频繁呕吐,吸入性肺炎,严重者导致患儿发育延迟,甚至窒息猝死等.临床上对本病治疗多采用药物、体位、饮食等保守疗法,效果不好,是国内外研究的前沿课题.我们已通过猪仔^[1]动物模型实验及临床病例观察^[2],认为胃排空障碍、蠕动节律紊乱、胃幽门窦

十二指肠蠕动不协调是造成GER的主要原因.我们采用兔动物模型实验及临床病例观察证实体外胃电起搏反馈治疗可增强胃蠕动,促进胃排空,调节胃幽门窦十二指肠的协调蠕动,是治疗小儿GER的有效方法.

1 材料和方法

1.1 实验资料 生后2 mo的日本大耳白兔24只,质量1.0~1.3 kg,由中国医大二院动物实验室提供.250 g/L乌拉坦溶液(4 mL/kg)ip麻醉,取剑突下切口常规开腹,其中对照组动物8只仅行开腹手术,模型组动物16只开腹后行前后两侧胃壁浆肌层切除1/4,黏膜凸起裸露.制成动物模型后统一喂养,术后第7 d同位素扫描检查胃排空和胃残留情况,然后随机选取模型组动物8只行体外胃电起搏反馈治疗(WD-5型双路数显胃生物电起搏治疗仪,厦门市医药研究所研制),电极置于胃体部和幽门窦部体表投影处,调节适当的频率,进食30 min后开始治疗,每次20 min,2次/d,另外8只模型组动物不作治疗,统一喂养2 wk后行同位素扫描,检查胃排空和胃残留情况.

1.2 临床资料 钡餐透视^[3]诊断为胃食管反流,程度II级及II级以上的患儿42例,又经24 h双pH监测确诊为胃食管反流,男28例,女14例,其中40~180 d 20例,占48%;7~12 mo 9例,占21%;2岁6例,占13%;3~6岁7例,均为食管裂孔疝术后患儿,占17%.临床症状均以呕吐为主伴食欲不振及体重减轻,较同龄儿降低10~20%,病史长短不一,症状逐渐加重就诊.对所有病例分别行胃排空核素扫描、胃电图检查.同期因体表血管瘤或淋巴管瘤等,无消化道症状的患儿20例作为对照组,男女各10例,年龄40 d~6岁,在家长同意下,免费行各项指标检测.已确诊为GER的42例患儿入院后,均行体外胃电起搏反馈治疗,采用WD-5型双路数显胃生物电起搏治疗仪.患儿取仰卧位,于胃的体表投影胃幽门窦部和胃体部放置胃电起搏电极,调节患儿能耐受的频率,根据胃电图结果频率值加減0.2~0.4次/min(向3次/min方向)为最佳治疗频率,幅度选择依患儿感觉而定,患儿腹部有轻微针刺样感觉或稍有灼热感为止,1~6 mo患儿以0.2~0.4 mA电流强度为宜,6 mo以上患儿为0.5 mA左右,最大幅度不超过0.6 mA,并可根据需要适当增减.选定时间和音乐,餐后20 min开始治疗,每次20 min,3次/d,疗程7 d,1疗程后观察患儿的临床症状、胃排空情况、胃电图结果,2 wk后行钡餐透视和双pH值监测.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件进行统计学处理,所有数据均以mean ± SD表示, $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 实验资料结果揭示模型组与对照组相比胃排空率降低,半排时间明显延长($P < 0.05$),模型组经胃电起搏

反馈治疗后胃排空率增加,半排时间缩短,其数值接近正常组(表1).

表1 兔仔动物模型及起搏治疗后核素扫描结果

分组	n	半排时间(min)	排空率(%)	残留率(%)
对照组	8	85.2±9.3	68.8±6.2	29.5±6.3
模型组	16	198.5±116.8 ^a	47.5±18.7 ^a	52.8±18.6 ^a
模型组未治疗	8	228.5±96.8	43.5±9.7	56.8±10.6
模型组起搏治疗	8	105.2±16.3 ^b	70.1±6.2 ^b	29.5±6.3

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^b $P < 0.05$ vs 模型组未治疗.

2.2 临床资料结果显示 GER小儿规律治疗后,临床症状明显改善,呕吐次数明显减少或消失,食欲增加,体重增长.胃电图结果显示胃正常慢波百分率(normal range percent, N%)增加且规律,胃动过速百分率(tachygastria, T%)胃动过缓百分率(bradycastria, B%)明显减少,胃电节律趋于正常;主频(dominant frequency, DF)变化不大,略有增高;餐后主频不稳定系数(dominant frequency instability coefficient, DFIC)降低,差异不明显;治疗后患儿餐前、餐后的主功率(dominant power, DP)分别较治疗前明显提高,差异显著($P < 0.05$,表2).胃搏起治疗后患儿的胃半排时间明显缩短,胃排空率增加($P < 0.05$),差异显著,具有明显统计学意义(表3).

表2 GER患儿胃起搏治疗前后胃电图结果

	治疗前		治疗后	
	餐前	餐后	餐前	餐后
DF(次/min)	1.1±1.2	1.0±0.9	1.2±1.4	1.2±1.3
DP(μV)	1 226±1 073	1 469±1588 ^a	2 197±2 233	2 448±2 136 ^a
N%	52.4±28.7	60.6±25.4	75.4±18.7	81.5±17.7
B%	15.2±14.2	12.4±13.2	8.2±11.8	10.1±14.5
T%	32.2±27.8	27.1±26.3	16.4±14.7	8.41±9.89
DFIC	102.3±36.7	102.0±34.2	100.3±25.2	68.6±32.0

^a $P < 0.05$

表3 正常儿、GER患儿胃起搏治疗前后ECT结果

分组	半排时间(min)	排空率(%)	残留率(%)
对照组	39.9±6.5	83.5±2.7	16.5±2.7
反流组	188.5±116.8 ^a	53.5±18.7 ^a	46.8±18.6 ^a
起搏治疗组	54.2±9.3 ^b	78.8±6.2 ^c	21.5±6.3 ^c

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs GER患儿起搏治疗前.

3 讨论

小儿GER常见,起初多认为是生理性呕吐而被忽视,病情进一步发展将出现顽固性呕吐,反流性食管炎,

小型食管裂孔疝和经常出现肺内感染,并可导致患儿营养不良、发育迟缓。小儿GER是多因素造成的,食管蠕动弛缓清除率低下,食管下端括约肌松弛,膈肌脚开大等是导致GER的原因已有报道,而关于胃电起搏系统,cajal细胞网络组织病变^[4]造成胃功能障碍与小儿GER的关系研究尚未见到报道。我们通过猪仔^[1]及兔的动物模型实验、临床病例观察^[2]发现胃蠕动节律紊乱,胃蠕动过缓呈膨胀状态^[5-6],不但使腹段食管变短而且使胃窦部与十二指肠蠕动不协调不能形成梯度差是造成小儿GER的主要原因。

目前对小儿GER的治疗是采用坐位体位,粘稠饮食,胃动力药^[7]、抗酸药、胃黏膜保护剂等疗法,效果不佳。胃起搏是近年来胃肠生理及临床医学的新兴课题^[8-11],我们采用体外胃生物电起搏治疗小儿GER有较好疗效,原理是基于人胃起搏点的电活动可被外加的电流刺激所“驱动”,利用电子技术产生的与人体电节律相似的电信息,使胃电活动产生跟随效应,加强胃的慢波活动,恢复正常的胃电节律和波幅,由于胃蠕动增强促进乙酰胆碱的释放以及钙离子通道的开放诱发峰电位的出现,增加胃收缩力及胃排空。杨敏 *et al*在胃动力紊乱犬证实了胃起搏可改善胃电参数,纠正异常胃电节律^[12-13]。王虹 *et al*认为胃电起搏仪具有改善胃功能紊乱患者症状和胃肌电节律紊乱的作用^[14]。Abell *et al*认为胃肠起搏能逆转胃电节律异常,建立正常的起搏电位,纠正胃排空障碍,为胃电节律紊乱的治疗提供了一个新途径^[15]。我们首先通过兔动物模型观察发现经胃起搏治疗后胃排空率增加,半排时间缩短,疗效确切且操作简单,无副作用,便于临床患儿接受。在临床研究中正常儿胃电图监测发现胃N%稳定,胃蠕动节律正常,胃B%,T%减少,胃电主频在2-4次/min之间,经X线钡餐透视,24h双pH监测确诊为GER的患儿胃电图监测发现餐前餐后N%明显降低,T%、B%升高,出现明显胃电节律紊乱,24h pH监测多表现为酸性反流,同位素扫描胃排空较正常儿明显延迟。采用胃起搏治疗我们选择的最佳治疗频率为以患儿胃电图频率值加或减0.2-0.4次/min,异位起搏点引起的节律紊乱可被3次/min或大于正常10%的频率校正为正常频率,并使胃电节律正常化^[16]。应用体外胃电起搏反馈治疗7-14d后,再次检查对比结果GER患儿胃电节律紊乱经体外胃电起搏治疗后患儿N%明显增加,规律化,B%,T%明显减少,胃电节律趋于正常,餐前、餐后主功率分别较治疗前显著提高,其他指标趋向正常;临床症状明显改善,呕吐次数减少,食欲增加,体重增长;24h双pH监测结果酸性反流及混合型反流显著减少;钡餐透视GER现象消失,但食管裂孔疝术后GER

恢复较慢,胃节律紊乱纠正以后症状虽消失仍需治疗一段时间改善其功能,不断改善胃的肌电活动,协调食管、胃、十二指肠的蠕动;治疗后患儿经ECT检测证实胃半排时间明显缩短,胃排空率显著增加,残留率降低,可以看出体外胃生物电起搏仪可纠正胃节律紊乱,减少异位起搏的发生,建立正常的起搏点,促进正常胃蠕动功能恢复并使胃幽门窦和十二指肠协调运动,形成胃十二指肠蠕动的梯度差,从而消除GER。同时也证明了胃排空障碍是小儿GER的一个重要致病因素。

在当前小儿GER无特殊治疗手段的情况下,采用体外胃生物电起搏反馈治疗是一种无损伤有效的治疗方法,见效快,疗程短,疗效确切,有广泛的应用前景。

4 参考文献

- 1 陈立天,李心元,张可仞,郝晶,蒋涛.机械性胃功能障碍与胃食管反流的动物实验研究. *中华小儿外科杂志* 2003;24:56-57
- 2 陈立天,张继红,李心元.胃食管反流胃肌电活动变化的研究. *中国医科大学学报* 2003;10:446-447
- 3 潘旭,李松庆,林阳.儿童胃食管反流的X线诊断. *华人消化杂志* 1998;6(特刊7):153-155
- 4 王虹,刘实.胃食管反流性疾病的研究回顾. *世界华人消化杂志* 2001;9:1041-1044
- 5 Stacher G, Lenglinger J, Bergmann H, Schneider C, Hoffmann M, Wolf G, Stacher-Janotta G. Gastric emptying: a contributory factor in gastro-oesophageal reflux activity? *Gut* 2000; 47:661-666
- 6 Buckles DC, Sarosiek I, McMillin C, McCallum RW. Delayed gastric emptying in gastroesophageal reflux disease: reassessment with new methods and symptomatic correlations. *Am J Med Sci* 2004;327:1-4
- 7 Hasler WL. The brute force approach to electrical stimulation of gastric emptying: a future treatment for refractory gastroparesis? *Gastroenterology* 2000;118:433-446
- 8 Forster J, Sarosiek I, Delcore R, Lin Z, Raju GS, McCallum RW. Gastric pacing is a new surgical treatment for gastroparesis. *Am J Surg* 2001;182:676-681
- 9 Bortolotti M. The "electrical way" to cure gastroparesis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1874-1883
- 10 Lin Z, Forster J, Sarosiek I, McCallum RW. Treatment of gastroparesis with electrical stimulation. *Dig Dis Sci* 2003;48: 837-848
- 11 Lin Z, Forster J, Sarosiek I, McCallum RW. Effect of high-frequency gastric electrical stimulation on gastric myoelectric activity in gastroparetic patients. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16:205-212
- 12 杨敏,房殿春,龙庆林,隋建峰,李钱伟,孙念绪.胃起搏对胃动力紊乱犬胃电活动的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:1152-1156
- 13 Yang M, Fang DC, Li QW, Sun NX, Long QL, Sui JF, Gan L. Effects of gastric pacing on gastric emptying and plasma motilin. *World J Gastroenterol* 2004; 10:419-423
- 14 王虹,顾清,高建萍,顾而立,周磊,孙一俊,张悦.胃起搏治疗胃肠动力紊乱患者12例. *世界华人消化杂志* 2002;10:244-245
- 15 Abell TL, Malagelada JK. Glucagon-evoked gastric dysrhythmias slow in improved electrogastrographic technique. *Gastroenterology* 1985;88:1932-1940
- 16 Lin ZY, McCallum RW, Schirmer BD, Chen JD. Effects of pacing parameters on entrainment of gastric slow waves in patients with gastroparesis. *Am J Physiol* 1998;274(1 Pt 1):G186-G191